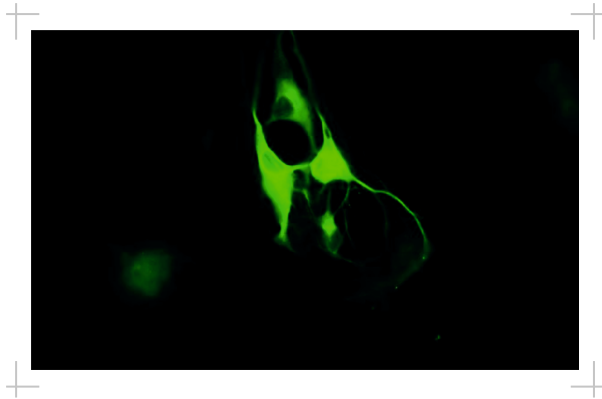


Kommunikation zwischen Mastzellen und enterischen Neuronen

Ein Modell der Nahrungsmittelallergie bei der Ratte

Anna Kristina Bell



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

Ph.D.

der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Kommunikation zwischen Mastzellen und
enterischen Neuronen – Ein Modell der
Nahrungsmittelallergie bei der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

Ph.D.

der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Anna Kristina Bell

Tierärztin aus Köln

Gießen 2015

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Betreuer und erster Gutachter: Prof. Dr. Martin Diener

zweiter Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jörg Aschenbach (Freie Universität Berlin)

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Jürgen Lohmeyer

Beisitzer: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Datum der Disputation: 15. Juli 2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Bedeutung der Nahrungsmittelallergie.....	1
1.2. GALT und orale Toleranz.....	3
1.3. Mechanismus der Nahrungsmittelallergie.....	8
1.4. Mastzellen.....	12
1.5. Das enterische Nervensystem.....	15
1.6. Interaktionen zwischen enterischem Nervensystem und Immunsystem.....	19
1.7. Histaminrezeptoren.....	22
1.8. Fragestellung.....	23
2. Material und Methoden.....	24
2.1. Tiere.....	24
2.2. Zelllinie.....	24
2.3. Lösungen.....	24
2.3.1. Lösungen für die Präparation sowie für die funktionellen Experimente.....	24
2.3.1.1. Bicarbonatgepufferte Parsons-Lösung.....	24
2.3.1.2. Tyrode.....	25
2.3.1.3. Ca^{2+} -freie Tyrode.....	25
2.3.1.4. Na^{+} -freie Tyrode.....	25
2.3.1.5. Färbelösung mit Fura-2-AM und Pluronic Acid.....	25
2.3.2. Lösungen für die Zellkulturen.....	26
2.3.2.1. Präparationslösung.....	26
2.3.2.2. Enzymatische Digestionslösung.....	26
2.3.2.3. Neurobasal-A-Medium zur Kultivierung der primären Submukosa -Kultur..	26
2.3.2.4. MEM α -Medium zur Kultivierung der RBL-2H3-Zellen und der Co-Kultur.	26
2.3.2.5. Einfriermedium der RBL-2H3-Zellen.....	26
2.3.3. Lösungen für die immunzytochemischen Markierungen.....	27
2.3.3.1. Phosphatpuffer (PB).....	27
2.3.3.2. Phosphatpuffersalzlösung (PBS-Lösung).....	27
2.3.3.3. Triton-X-100-haltige PBS-Lösung.....	27

2.3.3.4. Fixierungslösung.....	27
2.3.3.5. Blockierungslösung.....	28
2.3.3.6. Primärantikörperlösungen.....	28
2.3.3.7. Sekundärantikörperlösungen.....	28
2.3.3.8. Lösung zur Kernfärbung.....	28
2.4. Wirkstoffe.....	28
2.5. Präparation.....	29
2.5.1. Präparation der Submukosa-Mukosa-Präparate für die Ussingkammer-Messungen...	29
2.5.2. Präparation der Jejunumsegmente für die Ussingkammer-Messungen.....	30
2.5.3. Präparation der Submukosa für Ca^{2+} -Imaging-Experimente und Mikroelektroden-Messungen.....	30
2.6. Zellkultur.....	32
2.6.1. Primäre Zellkultur der Submukosa aus dem Kolon der Ratte.....	32
2.6.1.1. Kulturbedingungen der primären submukösen Zellkultur.....	32
2.6.1.2. Herstellung der primären submukösen Zellkultur.....	32
2.6.2. Zelllinie RBL-2H3.....	33
2.6.2.1. Kulturbedingungen.....	33
2.6.2.2. Auftauen der Zellen.....	34
2.6.2.3. Passagieren der Zellen.....	34
2.6.2.4. Einfrieren der Zellen.....	35
2.6.3. Co-Kultur aus kultivierten Zellen der Submukosa der Ratte und RBL-2H3-Zellen...	35
2.6.3.1. Kulturbedingungen der Co-Kultur.....	35
2.6.3.2. Herstellung der Co-Kultur.....	36
2.7. Beschichtung der Glasplättchen sowie der Zellkulturschalen.....	36
2.8. Protokoll zur Immunisierung der Ratten mit Ovalbumin.....	37
2.9. Ca^{2+} -Imaging.....	38
2.9.1. Theorie des Ca^{2+} -Imagings.....	38
2.9.2. Fluoreszenzfarbstoff Fura-2.....	40
2.9.3. Messstand.....	42
2.9.4. Messkammer und Perfusionssystem.....	43
2.9.5. Versuchsdurchführung.....	43
2.9.6. Datenerfassung und Datenauswertung.....	45
2.10. Indirekte Immunfluoreszenz.....	46
2.10.1. Grundlagen der indirekten Immunfluoreszenz.....	46

2.10.2. Verwendete Antikörper.....	48
2.10.3. Negativkontrollen.....	49
2.10.4. Fixierung der Zellkulturen.....	50
2.10.5. Herstellung der immunzytochemischen Doppelmarkierungen.....	51
2.10.6. Mikroskopie.....	53
2.11. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	53
2.11.1. Prinzip der PCR.....	53
2.11.2. Isolation der mRNA.....	56
2.11.3. Reverse Transkription (RT) zur Synthese der cDNA.....	56
2.11.4. PCR zur Amplifizierung der cDNA.....	58
2.11.5. Gelelektrophorese.....	60
2.12. Mikroelektroden-Ableitung des Membranpotentials.....	61
2.12.1. Die Ermittlung des Membranpotentials mittels Mikroelektrode.....	61
2.12.2. Versuchsdurchführung.....	61
2.13. Ussingkammer-Messungen.....	63
2.13.1. Theorie der Ussingkammer-Messungen.....	63
2.13.2. Messkammer.....	65
2.13.3. Versuchsdurchführung und Datenerfassung.....	66
2.14. Messungen der parazellulären Permeabilität.....	67
2.15. Statistik.....	69
3. Ergebnisse.....	70
3.1. Untersuchung der Histaminwirkung auf Neurone des Plexus submucosus aus dem Kolon der Ratte.....	71
3.1.1. Charakterisierung der Wirkung von Histamin auf Neurone der primären submukö- sen Zellkultur.....	71
3.1.1.1. Konzentrationsabhängige Histaminwirkung von kultivierten submukösen Neuronen.....	72
3.1.1.2. Der Einfluss von Tetrodotoxin auf die Histaminwirkung.....	76
3.1.1.3. Identifizierung der Calciumquelle für die Histaminwirkung.....	76
3.1.1.4. Die Untersuchung des paradoxen Histamineffektes in Gegenwart von Cyclopiazonsäure.....	82
3.1.2. Identifizierung der beteiligten Histaminrezeptoren.....	86

3.1.2.1. RT-PCR.....	86
3.1.2.2. Immunzytochemische Doppelmarkierungen.....	88
3.1.2.3. Funktionelle Identifizierung mittels Agonisten.....	90
3.1.2.4. Funktionelle Identifizierung mittels Antagonisten.....	92
3.1.3. Die Wirkung von Histamin auf Neurone des intakten Plexus submucosus.....	96
3.1.3.1. Die Reaktion von Neuronen des intakten Plexus submucosus auf Histamin im Ca ²⁺ -Imaging.....	96
3.1.3.2. Die Änderung des Membranpotentials durch Histamin in Neuronen des intakten Plexus submucosus.....	96
3.2. Die Expression des Enzyms Histidindecaboxylase in Neuronen des Plexus submucosus...	98
3.2.1. Immunzytochemische Doppelmarkierungen.....	98
3.2.2. RT-PCR.....	99
3.3. Die Kommunikation zwischen kultivierten submukösen Neuronen und RBL-2H3-Zellen am Modell der Co-Kultur.....	101
3.3.1. Die Stimulation submuköser Neurone durch Degranulation von RBL-2H3-Zellen..	101
3.3.1.1. Der Effekt von Compound 48/80 auf RBL-2H3-Zellen.....	101
3.3.1.2. Der Effekt von Compound 48/80 auf kultivierte submuköse Neurone.....	102
3.3.2. Untersuchung beteiligter Mastzellmediatoren.....	106
3.3.2.1. Die Beteiligung von Histamin.....	107
3.3.2.2. Die Beteiligung von Eicosanoiden.....	110
3.3.2.3. Die Beteiligung von Mastzellproteasen.....	111
3.3.3. Untersuchung der möglichen Aktivierung von RBL-2H3-Zellen durch Stimulation submuköser Neurone.....	113
3.4. Untersuchung der Antigenwirkung auf epithelialen Transport und parazelluläre Permeabilität an sensibilisierten Tieren.....	115
3.4.1. Antigeninduzierte Veränderungen des Kurzschlussstroms und der parazellulären Fluxe am Kolon	116
3.4.1.1. Änderung des Kurzschlussstroms.....	116
3.4.1.2. Beteiligung verschiedener Mastzellmediatoren	117
3.4.1.3. Änderung der parazellulären Permeabilität.....	120
3.4.2. Antigeninduzierte Veränderungen des Kurzschlussstroms und der parazellulären Fluxe am Jejunum.....	122
3.4.2.1. Änderung des Kurzschlussstroms.....	122
3.4.2.2. Beteiligung verschiedener Mastzellmediatoren.....	122

3.4.2.3. Änderung der parazellulären Permeabilität.....	125
4. Diskussion.....	128
4.1. Die Bedeutung des allergischen Mediators Histamin und seine Wirkung auf submuköse Neurone.....	129
4.2. Interaktionen zwischen submukösen Neuronen und RBL-2H3-Zellen in der Co-Kultur....	139
4.3. Untersuchung von I_{sc} und passiver Permeabilität im Allergiemodell.....	149
4.4. Fazit.....	155
5. Zusammenfassung.....	158
6. Summary.....	160
7. Literaturverzeichnis.....	161
8. Eigene Publikationen.....	173
9. Danksagung.....	174
10. Erklärung.....	175

Abkürzungsverzeichnis:

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
ANOVA	Analysis of variance
APC	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C	Komponenten des Komplementsystems
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CHO	chinese hamster ovary cells
COX	Cyclooxygenase
CPA	Cyclopiazonsäure
CRF	corticotropin releasing factor
CRTH2	chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells
CTMC	connective tissue mast cells
Δ	Änderung eines Parameters
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENS	Enterisches Nervensystem
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fc	fragment crystallizable
Fc ϵ RI	high-affinity IgE receptor
FGF	fibroblast growth factor
FLAP	5-lipoxygenase-activating protein
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethylester
GALT	gut-associated lymphoid tissue
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gew	Gewicht
GGLT	γ -glutamyl Leukotrienase

GGT	γ -glutamyl Transpeptidase
G-Protein	Guanosintriphosphat(GTP)-bindendes Protein
G _t	Gewebeleitfähigkeit
HDC	Histidindecaboxylase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
H-Rezeptor	Histaminrezeptor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
I _{sc}	short-circuit current
LOX	5-Lipoxygenase
LSD	Fisher's Least Significant Difference
LT	Leukotrien
MAP	mitogen-activated protein
MAP2	microtubule-associated protein 2
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
MMC	mucosal mast cells
mRNA	messenger RNA
MRP	multidrug resistance-associated protein
NGF	nerve growth factor
NMDG	D(-)-N-Methylglucamin
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PAF	platelet activating factor
PAR	protease-activated receptor
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatpuffersalz
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pd	Potentialdifferenz
PG	Prostaglandin
PGT	Prostaglandin Transporter
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C

RBL-2H3	rat basophilic leukemia cells, Mastzelläquivalent
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
RT	Reverse Transkription
SCF	stem cell factor
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwerts
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic reticulum calcium ATPase
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF β	transforming growth factor β
TH	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMPH	Trifluoromethylphenylhistamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TR	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
UV	ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
Vol	Volumen
W/W ^v	Mastzell-defiziente Mäuse
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der Nahrungsmittelallergie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Mediators Histamin auf enterische Neurone des Plexus submucosus untersucht. Die Untersuchung des Zusammenspiels zwischen enterischem Nervensystem und Immunsystem ist vor allem im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung von Nahrungsmittelallergien von großem Interesse.

In hoch industrialisierten Ländern wie Deutschland oder Großbritannien leiden circa 20% der Bevölkerung an Nahrungsmittelunverträglichkeiten (Young et al. 1994, Schäfer et al. 2001). Der Begriff der **Nahrungsmittelunverträglichkeit** beschreibt dabei alle gesundheitlichen Probleme, die mit Nahrungsmittelkomponenten in Zusammenhang stehen. Dazu zählen neben Allergien auch Intoleranzen sowie Intoxikationen, also Schädigungen durch präformierte Toxine in Nahrungsmitteln. Intoleranz bezeichnet die Unfähigkeit des betroffenen Organismus bestimmte Nahrungsmittelbestandteile zu verdauen bzw. zu resorbieren (Kraneveld et al. 2012). Ein bekanntes Beispiel für eine Nahrungsmittelintoleranz ist die weit verbreitete Laktose-Intoleranz, die, global betrachtet, sicherlich die wichtigste Nahrungsmittelunverträglichkeit darstellt. Allergien gegen Nahrungsmittel stellen im Gegensatz dazu eine Reaktion des Immunsystems gegen einzelne Bestandteile der Nahrung dar. Bei Nahrungsmittelallergien handelt es sich also um erworbene immunologische Überempfindlichkeiten, die meist aufgrund von unangemessen starken IgE-vermittelten Immunreaktionen entstehen (Bischoff und Crowe 2005, Kraneveld et al. 2012).

In Deutschland leiden etwa 4 % der erwachsenen Bevölkerung an **Nahrungsmittelallergien**, unter Kindern liegt die Prävalenz bei 6 – 8 % (Bischoff und Crowe 2005). Gerade in den hochindustrialisierten Nationen wie Deutschland, Großbritannien oder den Vereinigten Staaten von Amerika steigt die Anzahl der betroffenen Personen. Der genaue Zusammenhang zwischen dem Grad der Industrialisierung und dem vermehrten Auftreten von Nahrungsmittelallergien ist nicht abschließend geklärt. Verschiedene Studien legen jedoch nahe, dass die Hygiene hier eine entscheidende Rolle spielt. Die aufgrund dieser Studien formulierte „Hygiene-Hypothese“ geht davon aus, dass zur voll-

1. Einleitung

ständigen Entwicklung des adaptiven Immunsystems - und zu Teilen auch des sekretorischen IgA-Systems - der Kontakt mit einer hohen Diversität von Mikroorganismen, sowohl kommensalischen als auch pathogenen, Parasiten und Chemikalien notwendig ist (Bischoff und Crowe 2005).

Am häufigsten liegen Allergien gegen Milch, Eier, Erdnüsse, Fisch, Meeresfrüchte, Weizen und Soja vor (Sicherer und Sampson 2010). Prinzipiell können jedoch gegen jedes Nahrungsmittel überschießende Immunreaktionen ausgebildet werden. Welche strukturellen und biochemischen Eigenschaften eines Nahrungsmittels zu dessen Allergenität beitragen, ist unklar. Häufig scheint die Ursache einer Allergie abhängig von kulturellen Essgewohnheiten zu sein: Sesam konnte, neben Eiern und Milch, als ein wichtiges Allergen in Israel identifiziert werden (Dalal et al. 2002), in Nordamerika hingegen liegt die Prävalenz für eine Allergie gegen Sesam nur bei 0,1%, das wichtigste Allergen neben Milch und Eiern ist dort die Erdnuss (Sicherer und Sampson 2010). Ebenfalls gibt es Hinweise darauf, dass die frühe Auseinandersetzung mit einem möglichen Allergen die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Nahrungsmittelallergie verringert – eine Studie, die die Prävalenz der Erdnussallergie bei jüdischen Kindern aus Großbritannien und Israel miteinander verglich, zeigt eine zehnmal größere Prävalenz für die Ausprägung einer solchen Allergie in Großbritannien. Der Konsum von Erdnüssen im ersten Lebensjahr wird dort vermieden, in Israel werden sie auch von jungen Kindern verzehrt (Du Toit et al. 2008).

Symptome von Nahrungsmittelallergien können sich sehr unterschiedlich darstellen; es werden beispielsweise Durchfall, Erbrechen sowie abdominaler Schmerz beobachtet. Neben dem Magen-Darm-Trakt können jedoch auch andere Organsysteme Symptome zeigen. Betroffene können zum Beispiel an Rhinitis, Hautproblemen oder allergischem Asthma als Folge der Nahrungsmittelallergie leiden (Sicherer und Sampson 2010). Eine weitere Möglichkeit ist die Entwicklung eines lebensbedrohlichen allergischen Schocks. Die einzige bekannte Möglichkeit, ein gesundheitliches Risiko zu umgehen, besteht in der Vermeidung des Kontakts mit der auslösenden Noxe (Sampson 1999b). Hat ein Kontakt mit dem auslösenden Allergen stattgefunden, sind die Behandlungsmöglichkeiten sehr begrenzt. Die Verabreichung von Antihistaminika, die gegen die Histaminrezeptoren H_1 oder H_2 gerichtet sind, können Symptome einer IgE-vermittelten Allergie zwar teilweise maskieren (zum Beispiel Hautreaktionen), sind insgesamt jedoch nur

1. Einleitung

geringgradig wirksam. Chronische IgE-vermittelte Störungen (zum Beispiel allergisches Asthma) können durch die orale Gabe von Kortikosteroiden behandelt werden, hierbei kommt es jedoch zu starken Nebenwirkungen (Sampson 1999b). Bei einem anaphylaktischen Schock, mit dem bei Personen mit Asthma oder vorangegangener schwerer Reaktion auf Antigenkontakt gerechnet werden muss, kann die Injektion von Adrenalin mit oraler Gabe von Diphenhydramin Abhilfe schaffen. Ein entsprechend ausgestattetes Notfallset sollten Betroffene stets bei sich tragen (Sampson 1999b).

Hunde und Katzen können ebenfalls unter Futtermittelallergien leiden. Meist nehmen sie das Antigen etwa zwei Jahre zu sich, bevor eine allergische Reaktion auftritt, in einigen Fällen sind jedoch auch junge Tiere unter einem Jahr betroffen. Die Tiere zeigen Hautkrankheiten oder gastrointestinale Beschwerden. Das häufigste Symptom ist Juckreiz, der sich meist nicht durch die Gabe von Kortikosteroiden beheben lässt. Aufgrund der häufig unspezifischen Symptomatik werden viele Fälle vermutlich nicht erkannt oder können nicht einwandfrei diagnostiziert werden – die exakte Prävalenz von Futtermittelallergien bei Hunden und Katzen ist dementsprechend nicht bekannt (Verlinden et al. 2006).

1.2. GALT und orale Toleranz

Der Gastrointestinaltrakt stellt eine bemerkenswert große Kontaktfläche zur Außenwelt dar. Die innere, sterile Umgebung des Körpers wird dabei nur durch eine durchgehende Reihe von Epithelzellen vom direkten Kontakt mit Nahrungsmitteln und anderen Substanzen, die mit der Nahrung aufgenommen wurden, getrennt (Chehade und Mayer 2005). Unterstützung erfährt das Epithel durch feste Tight Junctions, die stabile Zell-Zell-Verbindungen darstellen, eine dicke Mukusschicht auf der apikalen Seite der Epithelzellen, die dabei hilft Viren, Bakterien und verschiedenste Partikel fernzuhalten (Sicherer und Sampson 2010), sowie im Magen durch die Produktion der Magensäure. Diese unspezifischen Mechanismen bilden die mukosale Barriere. Zusätzlich existieren spezifische Abwehrstrategien, deren Ziel es ist, die Immunantwort gegen Nahrungsmittelantigene im Darm gering zu halten. Zu diesen Mechanismen zählen Plasmazellen, die Antikörper der Klassen IgA und IgM produzieren, sogenannte „tolerante“ antigenpräsentierende Zellen, immunsuppressive T-Zellen und T-Zell-Anergie sowie

1. Einleitung

-Apoptose. Diese Prozesse verringern das Risiko einer Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelproteine und damit der Entwicklung einer Nahrungsmittelallergie. Umgekehrt sind diese Mechanismen notwendig, damit sich eine Immuntoleranz im Gastrointestinaltrakt entwickeln kann (Chen et al. 1995, Groux et al. 1996).

Obwohl eine mukosale Barriere vorliegt, um den Organismus vor dem Eindringen von Antigenen zu schützen, wird der Darm tagtäglich mit zahlreichen Fremdstoffen konfrontiert. Bei einem gesunden Erwachsenen werden 2 % aller Antigene im Darm in - aus immunologischer Sicht - intakter Form aufgenommen und transportiert (Sampson 1999a). Aus diesem Grund herrscht dort eine sehr große Dichte von Immunzellen, die sich zu kleineren Lymphfollikeln und größeren Peyer'schen Plaques zusammenlagern. Lymphfollikel wurden im Dünndarm des Menschen, der Maus und anderen Spezies nachgewiesen (Moghaddami et al. 1998, Hamada et al. 2002, Spahn und Kucharzik 2004), wo sie antimesenterial in der Darmwand sitzen. Es wird vermutet, dass in den Lymphfollikeln die Immunantwort gegen Antigene im Darm induziert wird. Peyer'sche Plaques stellen große Ansammlungen von Immunzellen dar, die in dieser Form nur in der Dünndarmwand vorkommen. Sie sind Produktionsorte für IgA und spielen damit eine wichtige Rolle sowohl für die lokale als auch für die systemische Immunität. Sowohl die Lymphfollikel als auch die Peyer'schen Plaques bestehen aus B-Zell- und T-Zell-Arealen, die durchsetzt sind mit dendritischen Zellen. Umgeben sind beide von einem follikelassoziierten Epithel, welches auch spezialisierte Epithelzellen, die sogenannten M-Zellen, enthält. M-Zellen sammeln korpuskuläre Antigene und transportieren diese in den Follikel hinein, führen diese also dem Immunsystem zu (Spahn und Kucharzik 2004). Neben den bereits genannten verschiedenen Formen von lymphatischen Follikeln in der Mukosa befinden sich im Darm auch mesenteriale Lymphknoten. Die lymphatischen Gewebe im Darm werden zusammenfassend als darmassoziierte lymphatische Gewebe (gut-associated lymphoid tissue = GALT) bezeichnet. 70 % aller Immunzellen des Körpers und 80 % aller Plasmazellen befinden sich im Darm (Vighi et al. 2008) – damit stellt der Darm die größte Ansammlung von Immunzellen im gesamten Körper dar (Chehade und Mayer 2005). Der Großteil der dem GALT zugehörigen Zellen befindet sich im Dünndarm und damit am Hauptort der Resorption von Nahrungsbestandteilen (Faria et al. 2013).

1. Einleitung

Ab der Geburt wird der Gastrointestinaltrakt inklusive seines GALT mit fremden Proteinen in Form von Nahrungsmittelantigenen oder Bakterien konfrontiert. Zum einen müssen Nahrungsbestandteile zerlegt, aufgenommen und genutzt werden, um den Nährstoffbedarf zu decken, zum anderen muss der Körper aber auch dazu in der Lage sein, schnell und potent gegen aufgenommene Pathogene zu reagieren. Der Organismus steht also vor dem Problem, zwischen harmlosen Nahrungsmittelantigenen und Pathogenen zu unterscheiden. Indem eine orale Toleranz ausgebildet wird, schafft es das Immunsystem auf die enormen Mengen an Nahrungsmittelantigenen zu reagieren, ohne jedoch eine Entzündungsreaktion hervorzurufen (Sampson 1999a).

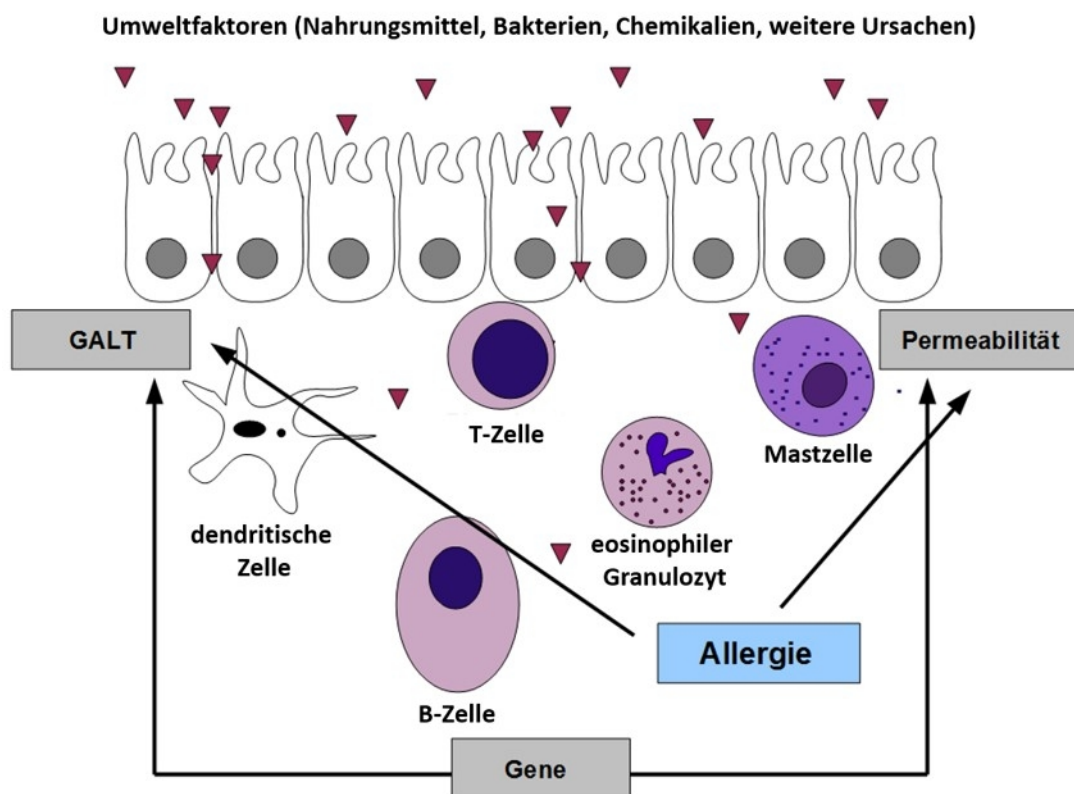


Abbildung 1.1. Faktoren, die für die Entwicklung von Allergien am Gastrointestinaltrakt verantwortlich sind. Verschiedene Umweltfaktoren gelangen transzellulär oder parazellulär durch die epitheliale Barriere und treffen auf die Zellen des GALT. Ob Immuntoleranz ausgebildet oder die Sensibilisierung eingeleitet wird, ist abhängig von den Genen, dem Typ der antigenpräsentierenden Zelle (z.B. dendritische Zelle, Makrophage, Epithelzelle) und der Zytokinproduktion der T_H2-Zellen. Die Immunantwort, die aus diesen Variablen resultiert, führt zur Aktivierung von B-Zellen und anderen Effektorzellen (z.B. Mastzellen, eosinophile Granulozyten) - es kommt zur allergischen Reaktion. Abbildung nach Bischoff und Crowe 2005

1. Einleitung

Frühere Untersuchungen der Immunantworten im Darm deuteten darauf hin, dass M-Zellen die wichtigsten Sammelpunkte für Antigene im Darm darstellen (Wolf und Bye 1984). Neuere Studien zeigen jedoch, dass auch den intestinalen Epithelzellen eine wichtige Funktion bei der Antigenaufnahme zukommt. Die Epithelzellen nehmen lösliches Antigen an der apikalen Seite auf, transportieren es durch die Zelle, prozessieren es und präsentieren es als „unprofessionelle“ antigenpräsentierende Zellen mithilfe von MHCII-Molekülen (MHC = major histocompatibility complex), welche diese Epithelzellen exprimieren, an ihrer basolateralen Oberfläche (Sampson 1999a). Ein Grund für die - im Sinne der Entwicklung einer oralen Toleranz sinnvolle - verminderte Aktivität des Immunsystems im Darm ist, dass mukosale antigenpräsentierende Zellen, wie die intestinalen Epithelzellen, deutlich weniger co-stimulatorische Moleküle, wie z.B. CD80 oder CD86 (CD = Cluster of differentiation), auf ihrer Oberfläche exprimieren. Kommt es zur Präsentation von prozessierten Antigenfragmenten ausschließlich über MHCII-Moleküle ohne Beteiligung von co-stimulatorischen Faktoren, so wird eine Unterdrückung der Immunantwort (in Form von T-Zell-Anergie oder Zerstörung von T-Zellen bzw. Aktivierung von CD8⁺ T-Suppressorzellen) induziert (Mayer und Shlien 1987, Bischoff und Crowe 2005).

Aus der Hypothese, dass lösliche Antigene vorwiegend von intestinalen Epithelzellen aufgenommen und präsentiert werden, ergibt sich außerdem, dass die Form (gelöst oder als Feststoff vorliegend) des Antigens eine Rolle bei der Induktion der oralen Toleranz spielt. Weitere Faktoren, die sich auf die orale Toleranz auswirken, sind die Dosis des Antigens, die natürliche kommensale Keimflora im Darm und auch das Alter. Bezüglich der Stärke der Antigenexposition gilt, dass hohe Dosen eines aufgenommenen Nahrungsmittelantigens in Lymphozyten-Anergie bzw. -Apoptose resultieren, wohingegen geringe Dosen eine Antwort induzieren, die durch regulatorische CD4⁺ T-Zellen vermittelt wird (Bischoff und Crowe 2005). Diese können in drei Untergruppen unterteilt werden, die sich durch die Synthese verschiedener regulatorischer Zytokine unterscheiden: T_H3-Zellen (Produktion von transforming growth factor β (TGF β)) sowie unterschiedlichen Mengen an Interleukin-4 (IL-4) und IL-10), T_R1-Zellen (Produktion von IL-10) und CD4⁺CD25⁺ Zellen (Produktion von IL-2). Mäuse, die in einer keimfreien Umgebung aufwachsen, können keine adäquate orale Toleranz ausbilden – dieses Ergebnis ei-

1. Einleitung

ner Studie von 1997 belegt, dass eine normale Keimflora für die orale Toleranz bedeutsam ist (Sudo et al. 1997).

Das Alter spielt bei der Ausbildung einer oralen Toleranz ebenfalls eine Rolle. Die mukosale Barriere ist bei Geburt noch nicht vollständig ausgebildet, sie muss erst heranreifen: In den ersten Lebensmonaten ist die basale Säuresekretion vermindert (Hyman et al. 1985), die proteolytische Aktivität ist noch bis zum Alter von etwa 2 Jahren vermindert (Lebenthal und Lee 1980) und die intestinalen Mikrovillimembranen sind noch nicht vollständig ausgereift. So kann ein höherer Anteil an Antigenen aufgenommen werden (Bresson et al. 1984). Des Weiteren fehlen dem Neugeborenen IgM- und IgA-Antikörper, sekretorisches IgA steht in den ersten Lebensmonaten nur geringgradig zur Verfügung (Burgio et al. 1980). Es entsteht eine Situation, die für das darmassoziierte lymphatische Gewebe nur schwer zu beherrschen ist. Durch die unvollständige mukosale Barriere kommt es zur erhöhten Exposition von Nahrungsmittelproteinen bei niedrigem Spiegel an sekretorischem IgA. Dies könnte einer der Gründe für die erhöhte Prävalenz von Nahrungsmittelallergien im Kindesalter sein (Chehade und Mayer 2005). Eine Studie konnte belegen, dass die absolute Anzahl der aufgenommenen Nahrungsmittelproteine in den ersten vier Lebensmonaten mit der Wahrscheinlichkeit, klinische Symptome einer Nahrungsmittelunverträglichkeit auszubilden, korreliert (Fergusson et al. 1990).

Lösliche Antigene werden demnach von intestinalen Epithelzellen gesammelt, aufgenommen und präsentiert, wodurch in der Regel eine Unterdrückung der Immunantwort entsteht, wohingegen feste Antigene und intakte Bakterien, Viren und Parasiten von M-Zellen aufgenommen werden und direkt in die Peyer'schen Plaques bzw. Lymphfollikel gelangen, wo sie auf B- und T-Lymphozyten treffen und eine klassische Immunantwort, insbesondere durch Sekretion von IgA, induzieren können (Sampson 1999a). Die aufgenommenen Antigene werden naiven B- und T-Lymphozyten präsentiert, dadurch kommt es im Fall der B-Zelle zur Aktivierung und Differenzierung zur antikörperproduzierenden Plasmazelle, im Fall der T-Zelle ebenfalls zur Aktivierung und Differenzierung zu Effektorzellen. Diese können, wenn sie CD4-Oberflächenmoleküle tragen, zu T-Helferzellen differenzieren, wenn sie CD8-Oberflächenmoleküle tragen, werden sie zu zytotoxischen T-Zellen oder zu T-Suppressorzellen. Nach der Aktivierung und Differenzierung der Lymphozyten kommt es zur klonalen Expansion und die Immunzellen ver-

1. Einleitung

lassen die sekundären lymphatischen Organe im Darm. Sie zirkulieren über die Lymphknoten und die efferenten Lymphbahnen bis in den Blutkreislauf und treten aus der Blutbahn wieder in den Darm ein. Diesen Prozess der Rezirkulation bezeichnet man als „Homing“ (Kobozev et al. 2010). Sowohl bei der Aktivierung von B- als auch von T-Lymphozyten bilden sich Gedächtniszellen, die im Falle eines erneuten Kontakts mit dem gleichen Antigen eine schnellere Immunreaktion (z.B. schnelle Bildung und Sekretion von spezifischen Antikörpern durch Plasmazellen) gewährleisten.

1.3. Mechanismus der Nahrungsmittelallergie

Bei einer Allergie handelt es sich um eine unangemessene Immunreaktion auf einen äußeren Reiz. Ein Nahrungsmittelantigen, welches eigentlich vom Körper als harmlos eingestuft werden und orale Toleranz induzieren sollte, kann plötzlich eine Abwehrreaktion des Körpers hervorrufen (Kaefer und Resch 2001). Bei allen Formen der Allergie kann man prinzipiell zwei Phasen voneinander unterscheiden. Die erste Phase, bei Erstkontakt mit dem Allergen, wird als Sensibilisierung bezeichnet. Betroffene merken von dieser Phase zunächst nichts, der Körper bereitet sich durch Bildung von Antikörpern oder Vermehrung von spezifischen T-Lymphozyten auf einen zweiten Antigenkontakt vor. Die zweite Phase stellt dann die eigentliche Effektorphase dar, diese geht mit der Ausprägung klinischer Symptome einher.

Hier können verschiedene Reaktionsformen der Allergie voneinander unterschieden werden. Eine Einteilung in **vier Grundreaktionstypen**, die Einteilung nach Coombs und Gell, hat sich hierbei durchgesetzt (Kaefer und Resch 2001). Die Hypersensitivitätsreaktion vom **Typ I**, auch als anaphylaktische allergische Reaktion bezeichnet, stellt die klassische Form der Allergie dar. Die Ausprägung der Symptome wird hier durch Antikörper der Klasse IgE vermittelt, die an die Oberfläche von Mastzellen binden und diese zur Degranulation bringen können. Die **Typ-II**-Allergie wird auch als zytotoxische allergische Reaktion bezeichnet. Die Effektorphase beruht ebenfalls auf der Bindung des Allergens durch zuvor gebildete Antikörper, allerdings handelt es sich hier um Antikörper der Klassen IgG und IgM. Die Allergene binden bei diesem Allergietyp vorzugsweise an Blutzellen, welche daraufhin vom Immunsystem als körperfremde Zellen behandelt werden. Antikörper binden an diese, es kommt zur Aktivierung des Komple-

1. Einleitung

mentsystems oder antikörperabhängiger zellulärer Effektormechanismen, welche dann die Zerstörung der antigentragenden körpereigenen Zellen zur Folge haben. Die allergische Reaktion vom **Typ III**, auch Immunkomplex-Reaktion genannt, beginnt ähnlich wie die Typ-II-Reaktion mit der Bildung von IgG- und IgM-Antikörpern. Diese Antikörper binden das Allergen, woraufhin sich Antigen-Antikörper-Komplexe bilden. Hierbei handelt es sich um einen physiologischen Prozess, der zur Eliminierung des Antigens führen soll. Kann das Antigen jedoch nicht zerstört werden, so kommt es zur Ablagerung der Immunkomplexe im Gefäßsystem und damit zur Aktivierung des Komplementsystems. Daraus resultiert eine Schädigung der Gefäße, welche einen Austritt der Immunkomplexe in die umgebenden Gewebe ermöglicht. Durch die aktivierten Komplementkomponenten kommt es zur Anlockung von Entzündungszellen und zum Versuch der Phagozytose der Immunkomplexe. Hierbei werden Entzündungsmediatoren freigesetzt, die im Gewebe klinische Symptome hervorrufen. Die allergische Reaktion vom **Typ IV** stellt eine zellvermittelte Immunreaktion dar. Die klinischen Symptome werden hier durch T-Lymphozyten ausgelöst. Prinzipiell handelt es sich hierbei um eine physiologische Reaktion, die erst zur Allergie wird, wenn sich das entsprechende Allergen nicht (oder nur sehr langsam) eliminieren lässt. Ein Beispiel hierfür sind Kontaktallergien, wie z.B. gegen Nickel in Knöpfen. Innerhalb der Typ-IV-Reaktionen kann man noch einmal zwischen zellvermittelten, zytotoxischen, allergischen Reaktionen (auch Typ IVa) und zellvermittelten, allergischen Reaktionen vom verzögerten Typ (auch Typ IVb) unterscheiden. Die Typ-IVa-Reaktion beruht auf der Bildung zytotoxischer T-Zellen (sie tragen den Oberflächenmarker CD8) – bei Kontakt mit Zellen, welche das Antigen gebunden haben, kommt es zur Zerstörung ebendieser. Bei der Reaktion vom Typ IVb bilden sich spezifische T-Helferzellen (Oberflächenmarker CD4), welche bei der Stimulation durch Antigene Lymphokine sezernieren. So werden Entzündungszellen (in erster Linie mononukleäre Phagozyten) angelockt (Chemotaxis) und aktiviert (Kaeffer und Resch 2001).

Bei der Einteilung der Allergien in die vier Grundtypen wird eine rein schematische Unterteilung vorgenommen. In der Realität kommen häufig Mischformen vor, da alle Allergene prinzipiell humorale und zelluläre Immunreaktionen induzieren können. Dies bedeutet, dass ein einziges Allergen Mechanismen auslösen kann, die sich mehreren Reaktionstypen zuordnen lassen. Kommt es zu einer dauerhaften Exposition gegenüber

1. Einleitung

dem Antigen, können Sensibilisierungsphase und Effektorphase der Allergie auch ineinander übergehen (Kaefer und Resch 2001).

Da es sich bei der Nahrungsmittelallergie klassischerweise um eine Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I handelt (Bischoff und Crowe 2005), werde ich diese im Folgenden detaillierter erläutern. Die Sensibilisierung, welche durch den ersten Antigenkontakt induziert wird, ist abhängig von der Aufnahme und Prozessierung des Antigens durch antigenpräsentierende Zellen. Dabei kann es sich um dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Lymphozyten handeln, die nachfolgend Antigenfragmente auf ihrer Oberfläche über MHCII-Moleküle naiven CD4⁺ T-Lymphozyten präsentieren. Diese T-Lymphozyten differenzieren sich daraufhin zu T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2 -Zellen.). T_H2-Zellen stellen die klassischen T-Zellen bei allergischen Reaktionen dar. Sie produzieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 und sind auf diesem Wege bei B-Zellen für den Klassenwechsel zu IgE-produzierenden Plasmazellen verantwortlich (induziert durch IL-4 und IL-13). Außerdem locken sie via Chemotaxis (vermittelt durch IL-4) Mastzellen und (vermittelt durch IL-5) eosinophile Granulozyten an (Eigenmann und Frossard 2003). Antikörper vom Typ IgE, die von Plasmazellen gebildet und freigesetzt werden, binden daraufhin an die Oberfläche von Mastzellen, indem sie sich mit ihrem Fc-Teil (Fc = fragment crystallizable) an deren IgE-Rezeptor (high-affinity IgE receptor = FcεRI) binden. Dort verbleiben die IgE-Antikörper und warten auf Kontakt mit dem für sie spezifischen Antigen.

Kommt es nun zur erneuten Exposition mit dem entsprechenden Antigen, beginnt die Effektorphase, die sich in eine akute Phase und eine fakultative späte Phase gliedert. Die akute Phase kommt innerhalb von wenigen Sekunden bis Minuten nach Antigenexposition zustande. Sie entsteht, indem die mastzellständigen IgE-Antikörper das Antigen binden. Durch die Bindung kommt es zur Vernetzung von mindestens zwei IgE-Rezeptoren. Die Folge ist eine Aktivierung der Mastzelle mit daraus resultierender Degranulation, also Freisetzung ihrer Mediatoren mittels Exozytose sowie Neusynthese und unmittelbarer Freisetzung von Mediatoren in die Umgebung (Bischoff und Crowe 2005).

Die späte Phase, welche nicht immer auftreten muss, beginnt etwa zwei bis 24 Stunden nach Antigenaufnahme. Es kommt zur Infiltration des Gewebes mit Lymphozyten, in erster Linie T_H2-Zellen, und eosinophilen und basophilen Granulozyten (Macfarlane et

1. Einleitung

al. 2000). Durch stetig wiederkehrende späte Phasen und die damit einhergehenden Infiltrationen mit Entzündungszellen können auch chronische Krankheitszustände entstehen.

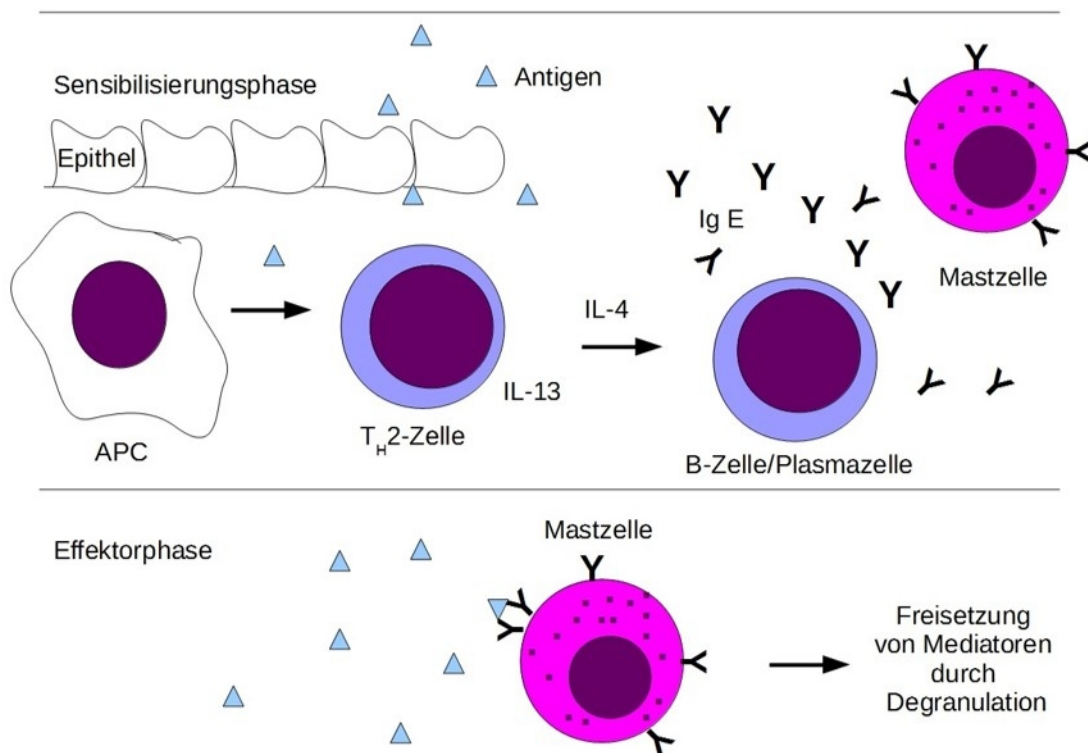


Abbildung 1.2. Vereinfachtes Schema des Ablaufs einer allergischen Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I. Mit dem Durchtritt eines Antigens durch die epitheliale Barriere kommt es zur Konfrontation mit Zellen des Immunsystems. Antigenpräsentierende Zellen (APC) nehmen das Antigen auf und präsentieren Fragmente des Antigens auf ihrer Oberfläche für T-Lymphozyten. Nach Bindung des Antigenfragments durch den T-Zell-Rezeptor kommt es zur Differenzierung der T-Zelle sowie unter Mitwirkung von IL-4 und IL-13 zur Aktivierung von B-Zellen mit nachfolgender Differenzierung zu antikörperbildenden Plasmazellen. Spezifische Antikörper (IgE) werden von den Plasmazellen sezerniert und binden an die Oberfläche von Mastzellen. Diese erste Phase wird als Sensibilisierungsphase bezeichnet. Bei nochmaliger Konfrontation mit dem gleichen Antigen beginnt die Effektorphase. Durch die Bindung des Antigens an die oberflächenständigen IgE kommt es zum Cross-linking der Antikörper. Es resultiert die Aktivierung der Mastzellen, die mit der Freisetzung von präformierten und de novo synthetisierten Mediatoren einhergeht.

1. Einleitung

1.4. Mastzellen

Mastzellen gehören zu den Immunzellen. Es handelt sich um mononukleäre Zellen im Gewebe, die aus Vorläuferzellen im Knochenmark oder anderen hämatopoetischen Geweben entstehen. Das lichtmikroskopische Bild zeigt einen unsegmentierten ovalen und oft exzentrisch gelegenen Zellkern und zahlreiche charakteristische zytoplasmatische Granula (Maurer 2011). Sie entwickeln und differenzieren sich unter dem Einfluss ihrer Mikroumgebung sowie verschiedener Zytokine (z.B. stem cell factor = SCF) (Chen et al. 2005). Dementsprechend zeigen ausgereifte Mastzellen große organspezifische Unterschiede in Bezug auf ihre Morphologie, ihre biochemischen Eigenschaften, die Produktion von proteolytischen Enzymen und Zytokinen und ihre Funktion (Buhner und Schemann 2012). Allen gemein ist jedoch die Ausbildung von zytoplasmatischen Granula, die präformierte Mediatoren enthalten, sowie die Expression der oberflächenständigen Rezeptoren FcεRI für Immunglobuline vom Typ E und Kit für SCF (Maurer 2011). Des Weiteren gibt es große speziesspezifische Unterschiede in der Verteilung und der Dichte von Mastzellen im Körper, beispielsweise kommen im Magen-Darm-Trakt von Mäusen nur sehr wenige Mastzellen vor. Die Unterscheidung verschiedener Mastzelltypen ist ebenfalls je nach Spezies unterschiedlich. Während man Mastzellen beim Menschen anhand ihres Inhalts von Proteasen klassifiziert (hier unterscheidet man Trypsinase-haltige sowie Tryptase- und Chymase-haltige Mastzellen), unterscheidet man beim Nager anhand ihrer Lage zwei Gruppen von Mastzellen: die connective tissue mast cells (CTMC), die in der Umgebung von Gefäßen und in der Peritonealhöhle vorkommen, sowie die mucosal mast cells (MMC), die sich in erster Linie in der Lamina propria des Darms befinden (De Winter et al. 2012).

Mastzellen siedeln sich besonders in Geweben an, die Barrieren gegen körperfremde Substanzen darstellen, wie im Darm, im Respirationstrakt und in der Haut. Im Darm befindet sich die größte Population von Mastzellen in der Mukosa: 2 – 3 % aller Zellen in der humanen intestinalen Mukosa sind Mastzellen (Buhner und Schemann 2012). Sie gehören zum angeborenen (unspezifischen) Immunsystem, spielen aber auch bei adaptiven (spezifischen) Immunantworten eine große Rolle (Galli et al. 2005), sind wichtig bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen (Abraham und St John 2010, Galli und Tsai 2010) und bei der Autoimmunität (Rottem und Mekori 2005). Des Weiteren re-

1. Einleitung

gulieren sie durch die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren viele biologische Prozesse (Buhner und Schemann 2012).

Mastzellen spielen bei der klassischen Allergie, der Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I, eine zentrale Rolle. Wie bereits zuvor beschrieben, tragen sie auf ihrer Oberfläche hochaffine Rezeptoren für Immunglobuline vom Typ IgE. Diese Rezeptoren bestehen aus vier transmembranösen Polypeptidketten mit jeweils einer α -, einer β - sowie zwei γ - Ketten. Während der Sensibilisierungsphase der Typ-I-Allergie binden IgE-Antikörper mit ihrem Fc-Teil an die α -Kette des Rezeptors. Die anderen Untereinheiten des IgE-Rezeptors sind für die Signaltransduktion und -modulation zuständig (Maurer 2011). Dabei kommt es zur Vernetzung (Cross-linking) der IgE-Rezeptoren der Mastzelle und damit zur Aktivierung derselben. Zur Induktion der Mastzelldegranulation müssen mindestens zwei Fc ϵ RI durch Bindung von IgE miteinander vernetzt werden. Die Stärke der Mastzellaktivierung ist dabei (bis zum Erreichen eines Plateaus) direkt von der Anzahl an vernetzten Fc ϵ RI abhängig. Das bedeutet: je mehr Fc ϵ RI aggregiert sind, desto mehr Granula entleeren sich (Maurer 2011). Es gibt jedoch auch noch andere Wege, Mastzellen zu aktivieren: eine Reihe weiterer Immunglobuline (IgG1, IgG2a+b), immunoglobulin-free light chains, Zytokine, Hormone, Neuropeptide (Neurotensin, nerve growth factor (NGF), pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), Hämokinin, Substanz P), Komponenten des Komplementsystems (z.B. C3a, C5a) und die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) können eine Degranulation von Mastzellen auslösen (Kraneveld et al. 2012, De Winter et al. 2012, Theoharides et al. 2012).

Bei der Degranulation kommt es zur Freisetzung verschiedener Mediatoren mittels Exozytose. Diese parakrinen Botenstoffe wurden von der Mastzelle entweder bereits zuvor gebildet und dort in Granula gespeichert oder es kommt zur sogenannten De-novo-Synthese, das heißt durch die Aktivierung wird die Produktion und direkte Freisetzung von verschiedenen Mediatoren initiiert. Präformierte Mastzellmediatoren sind vasoaktive Amine (in erster Linie Histamin), Proteasen (Trypsin, Chymase), Peptide (Bradykinin, Substanz P, Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP), vascular endothelial growth factor (VEGF)) und Zytokine wie der Tumornekrosefaktor α (TNF α). Zu den de novo synthetisierten Mediatoren zählen Arachidonsäuremetaboliten, wie Prostaglandine und Leukotriene und platelet activating factor (PAF), Chemokine und Zytokine wie z.B. IL-1, IL-4-6, IL-9, IL-13 oder Interferon γ (IFN γ) (Kraneveld et al. 2012). Aufgrund ihrer Viel-

1. Einleitung

zahl an Mediatoren können Mastzellen auch eine Vielzahl von Symptomen vermitteln, wie beispielsweise Vasokonstriktion, Vasodilatation, Bronchokonstriktion, Gewebeschädigung, Schmerz und auch eine Infiltration mit Entzündungszellen (Kranefeld et al. 2012).

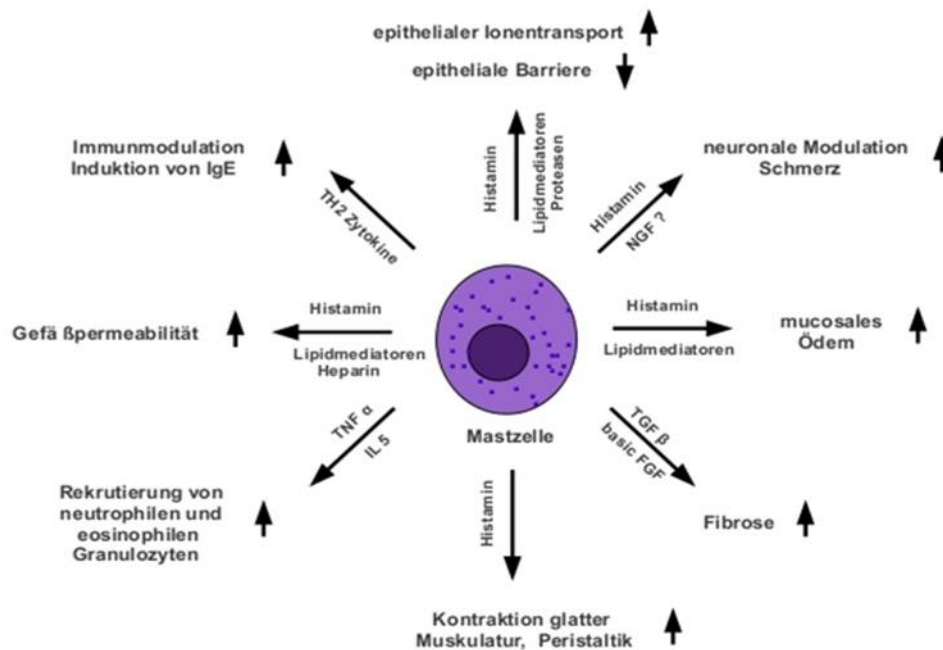


Abbildung 1.3. Verschiedene Wirkungen von Mastzellmediatoren. Durch Cross-linking von IgE kommt es zur Freisetzung verschiedener Mediatoren (z.B. Histamin, Lipidmediatoren, Proteasen, Zytokine, Wachstumsfaktoren wie TNF α , fibroblast growth factor (FGF), nerve growth factor (NGF), IL-5) aus Mastzellen. Mithilfe der Mediatoren regulieren Mastzellen den epithelialen Ionentransport, die Gefäßpermeabilität, die Kontraktion der glatten Muskulatur sowie Peristaltik, die Fibrogenese und die Funktion enterischer Neurone. Weiterhin kommt es zur Rekrutierung von Entzündungszellen (neutrophile und eosinophile Granulozyten) und zur Ödembildung. Abbildung nach Bischoff und Crowe 2005.

Bei der mastzellvermittelten Auslösung der Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I kommt der Freisetzung von **Histamin** eine besondere Bedeutung zu. Es zählt zu den biogenen Aminen und wird von dem Enzym Histidindecaboxylase durch Abspaltung von CO₂ aus der Aminosäure Histidin gebildet und gemeinsam mit aufgenommenem exogenem Histamin in die zytoplasmatischen Granula transportiert und dort gespeichert

1. Einleitung

(Maurer 2011). Histamin ist neben Mastzellen nur in basophilen Granulozyten enthalten, deshalb kann die Menge an messbarem Histamin als Marker für den Grad der Mastzelldegranulation verwendet werden (Buhner und Schemann 2012).

1.5. Das enterische Nervensystem

Das enterische Nervensystem stellt ein komplexes Geflecht aus einer Ansammlung von Millionen von Nervenzellen innerhalb des Gastrointestinaltrakts dar (Bayliss und Starling 1899). Je nach Tierart und -größe wird eine Anzahl zwischen 2 Millionen und 1 Milliarde Nervenzellen beschrieben (Furness 2006). Damit stellt das enterische Nervensystem die größte Ansammlung von Neuronen neben dem zentralen Nervensystem dar. Die Aufgabe des enterischen Nervensystems besteht in der Steuerung der Verdauungsvorgänge; es regelt die Resorption sowie Sekretion von Nährstoffen und Flüssigkeit sowie die Motilität und den Blutfluss im Magen-Darm-Trakt. Dabei stellt das enterische Nervensystem eine autonom agierende Einheit dar, der es möglich ist, die oben genannten Vorgänge bei der Verdauung unabhängig von Gehirn und Rückenmark zu regulieren (Bayliss und Starling 1899). Bereits sehr früh erfolgte die Unterteilung des enterischen Nervensystems in der Darmwand in zwei verschiedene Plexus. Meissner beschrieb bereits 1857 den submukösen Plexus, der bis heute auch als Meissner-Plexus bezeichnet wird (Meissner 1857). Nur wenige Jahre später charakterisierte Auerbach den myenterischen Plexus, auch als Auerbach-Plexus bezeichnet (Auerbach 1864).

Die beiden Plexus unterscheiden sich sowohl in ihrer Lage als auch in Bezug auf ihre Aufgaben. Der submuköse Plexus, welcher nicht im gesamten Gastrointestinaltrakt, sondern nur im Darm ausgebildet ist (Schemann 2000, Hansen 2003a), befindet sich in der Darmwand zwischen Submukosa und Mukosa (Abbildung 1.4.). Aufgrund seiner Nähe zur Mukosa und damit zur luminalen Seite des Darms steht er mit mukosalen Epithelzellen in Verbindung und reguliert die Resorption sowie Sekretion von Elektrolyten und Wasser (Bornstein und Furness 1988). Damit spielt der submuköse Plexus eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der Wasserhomöostase (Andres et al. 1985, Surprenant 1994). Des Weiteren innerviert der submuköse Plexus die Gefäße und Drüsen in der Submukosa und reguliert damit den Blutfluss sowie die Sekretion im Darm (Hansen 2003b). Im Gegensatz dazu befindet sich der myenterische Plexus in der Muskelschicht

1. Einleitung

der Darmwand, zwischen den longitudinal und den zirkulär verlaufenden Muskelfasern der Tunica muscularis (Abbildung 1.4.). Seine Aufgabe besteht in der Regulation der Motilität (Hansen 2003b). Diese klassische Aufteilung der Aufgaben von Plexus submucosus und Plexus myentericus trifft nur bedingt zu, beide Plexus innervieren auch das Wirkungsgebiet des jeweils anderen Plexus – jedoch nur zu einem geringeren Anteil (Hansen 2003b).

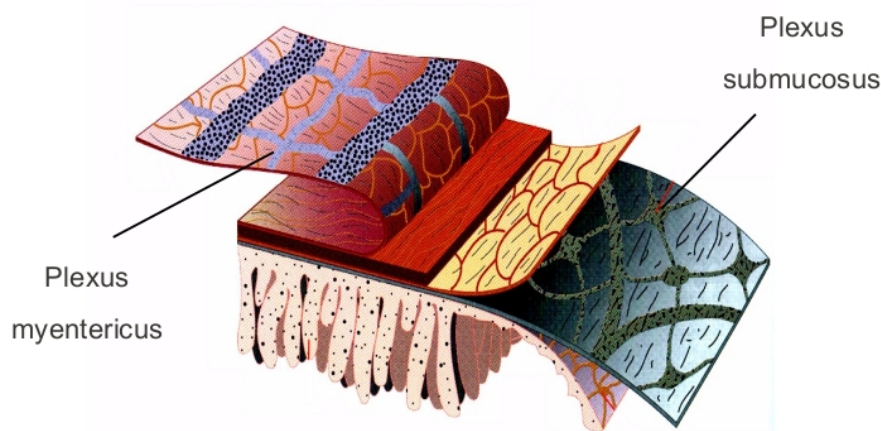


Abbildung 1.4. Die Lokalisation von Plexus submucosus und Plexus myentericus in der Darmwand. Der submuköse Plexus liegt zwischen der Mukosa mit dem Darmepithel und der Submukosa. Der myenterische Plexus befindet sich in der Tunica muscularis, zwischen longitudinaler und zirkulärer Muskelschicht. Quelle: Furness 2006

Die Nervenzellen beider Plexus liegen in Ganglien gebündelt vor. Je nach Tierart und Plexus bestehen diese Ganglien aus wenigen bis etwa zwanzig Neuronen. Die Ganglien innerhalb eines Plexus sind untereinander über interganglionäre Fasern, welche aus Neuronenfortsätzen bestehen, miteinander verbunden (Song et al. 1998). Auf diese Weise entsteht ein flächenhaftes Netzwerk, welches die Plexus charakterisiert. Im Plexus myentericus sind die Ganglien in einer typischen Netzstruktur miteinander verwoben, im Plexus submucosus kommt es jedoch zu einer ungeordneteren Verflechtung der Neurone (Furness und Costa 1980). Vergleicht man Plexus submucosus und Plexus myentericus weiter miteinander, so fällt auf, dass sowohl die Anzahl der Ganglien als auch die

1. Einleitung

Anzahl der Nervenzellen je Ganglion im submukösen Plexus geringer ausfallen als im myenterischen Plexus (Wood et al. 1999, Furness 2006).

Die beiden Plexus stehen untereinander über Nervenfasern miteinander in Kontakt (Hansen 2003a), außerdem gibt es eine enge Interaktion mit Sympathikus und Parasympathikus, also den beiden klassischen Anteilen des vegetativen Nervensystems, mit dem Zweck, die ansonsten weitgehend autonome Regulation des Magen-Darm-Trakts an die Bedürfnisse bzw. die Situation des Gesamtorganismus anzupassen (Cooke 1989, Phillips und Powley 2007).

Neben Plexus submucosus und Plexus myentericus, die in Ganglien strukturiert sind, sind weiterhin sogenannte aganglionäre Plexus in der Darmwand beschrieben. Zu diesen aganglionären Plexus zählt auch der mukosale Plexus, welcher aus Fasern von submukösen Neuronen besteht und nur in einzelnen Darmsegmenten (z.B. dem distalen Kolon der Ratte) auch neuronale Somata umfassen kann (Mestres et al. 1992a, 1992b).

Enterische Nervenzellen bilden, ebenso wie die Neurone im zentralen Nervensystem, viele verschiedene Neurotransmitter. Es wurden bereits über 20 verschiedene dieser Transmitter in enterischen Neuronen beschrieben (McConalogue und Furness 1994). Enterische Neurone synthetisieren jeweils eine bestimmte Kombination von verschiedenen Neurotransmittern, anhand derer man sie unterscheiden kann. Man spricht in diesem Zusammenhang von chemischer Kodierung. Welche Neurotransmitter ein enterisches Neuron ausbildet, ist dabei unter Anderem abhängig von der Spezies sowie dem Darmsegment, in welchem es sich befindet (Hansen 2003a). Es gibt neben der chemischen Kodierung weitere Möglichkeiten der Klassifizierung von enterischen Neuronen. Eine morphologische Unterscheidung anhand der Größe, Oberfläche sowie der Anzahl der neuronalen Fortsätze erfolgte erstmalig 1899 durch Dogiel. Er etablierte damit die Einteilung in die Klassen Dogiel Typ I, II oder III, die bis heute gebräuchlich ist, um enterische Neurone verschiedener Spezies zu beschreiben (Dogiel 1899). Eine funktionelle Unterscheidung der enterischen Neurone ermöglicht hingegen die Einteilung in sensorische Neurone, Interneurone sowie motorische Neurone, bei denen man wiederum muskelmotorische, sekretomotorische sowie vasomotorische Neurone unterscheiden kann (Hansen 2003a). Sensorische Neurone sind afferent, das heißt sie registrieren mechanische und chemische Änderungen im Darmlumen. Zu den sensorischen Neuronen zählen

1. Einleitung

Mechano-, Chemo- sowie Thermosensoren (Furness 2006). Unterschieden werden müssen hier intrinsische afferente Neurone, welche tatsächlich Teil des enterischen Nervensystems sind, da ihre Somata sich im Darm befinden, und extrinsische afferente Neurone, die im engeren Sinne kein Teil des enterischen Nervensystems darstellen, da sich ihre Zellkörper außerhalb des Darms befinden. Intrinsische Afferenzen leiten die gesammelten Informationen an Neurone in den verschiedenen Plexus des enterischen Nervensystems weiter und ermöglichen damit die Kontrolle der Verdauungsvorgänge. Extrinsische Afferenzen, hierzu zählen vagale und spinale Afferenzen, sind dagegen für die Weiterleitung von Informationen an das zentrale Nervensystem zuständig. Bei diesen Informationen handelt es sich vor allem um Daten bezüglich Energiehaushalt, Homöostase des Flüssigkeitshaushalts sowie Schmerz (Hansen 2003a). Interneurone stellen die Umschaltstellen zwischen verschiedenen Neuronen im enterischen Nervensystem dar. Dies kann eine Verschaltung von Neuronen im selben Ganglion, zwischen verschiedenen Ganglien, im selben Plexus aber auch zwischen verschiedenen Plexus bedeuten. Motorische Neurone bilden die efferenten Bestandteile des enterischen Nervensystems. Sie reagieren auf die Informationen, welche die Afferenzen gesammelt haben, und reagieren auf diese, indem sie entweder einen Abfall oder eine Steigerung der Motilität (muskelmotorische Neurone), der Sekretion (sekretomotorische Neurone) oder der Durchblutung (vasomotorische Neurone) des Darms induzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit Neuronen aus dem Plexus submucosus gearbeitet, um deren Reaktion auf Histamin und andere Mastzellmediatoren zu untersuchen. Die Entscheidung, ausschließlich die Rolle von submukösen Neuronen zu untersuchen und die myenterischen Neurone zunächst zu vernachlässigen, hatte zwei Gründe. Zum einen ist der submuköse Plexus aufgrund seiner Lage, das heißt aufgrund seiner Nähe zur luminalen Seite des Darms, das Netzwerk von Nervenzellen, welches zuerst mit einem aufgenommenen Allergen in Kontakt kommt. Zum anderen gibt es Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass die glatten Muskelzellen der Tunica muscularis selbst Histaminrezeptoren tragen und damit nicht auf eine Vermittlung von Wirkungen durch die Neurone des Plexus myentericus angewiesen sind (Bennett und Whitney 1966).

1. Einleitung

1.6. Interaktionen zwischen enterischem Nervensystem und Immunsystem

Im Mittelpunkt des Pathomechanismus von Nahrungsmittelallergien steht die Interaktion von Immunzellen und enterischen Neuronen (Wood 2012). Dieser Zusammenhang konnte anhand von verschiedenen Studien durch die Nutzung von Allergiemodellen, bei denen die Versuchstiere gegen ein bestimmtes Allergen sensibilisiert wurden, aufgezeigt werden. Ussingkammer-Experimente mit Submukosa-Mukosa-Präparaten aus dem Kolon von Meerschweinchen (Russel und Castro 1989) sowie aus dem Kolon von Ratten (Hug et al. 1996) brachten den Nachweis, dass die Gabe des Antigens, gegen welches die Tiere zuvor sensibilisiert wurden, zu einer Erhöhung des Kurzschlussstroms (das ist ein Maß für den Netto-Ionentransport durch das Epithel) und damit zu einer Erhöhung der Anionensekretion am Darmepithel führt. Dieser Effekt wurde durch die Applikation des Neurotoxins Tetrodotoxin (TTX) reduziert. Tetrodotoxin blockiert spannungsabhängige Natriumkanäle, welche zur Ausbildung von Aktionspotentialen benötigt werden (Catterall 1980). Die Möglichkeit, die durch Antigengabe hervorgerufene Sekretion durch die Verwendung von TTX zu blockieren, spricht für die Beteiligung von submukösen Neuronen an der Vermittlung des beobachteten Effektes am Darmepithel (Russel und Castro 1989, Hug et al. 1996). Eine Beteiligung von enterischen Neuronen aus dem Plexus submucosus an der Regulation der Sekretion von Darmepithelzellen konnte bereits zuvor durch einen ähnlichen Versuchsaufbau nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Cooke zeigte in Ussingkammer-Experimenten mit Submukosa-Mukosa-Präparaten aus dem Kolon von Meerschweinchen, dass neuronale Stimulation zu einer Epithelzellantwort in Form einer starken Chloridsekretion führt. Auch dieser Effekt war TTX-sensitiv (Kuwahara et al. 1987).

Die Interaktion zwischen dem Immunsystem, repräsentiert vor allem durch seine Komponente Mastzellen, und dem enterischen Nervensystem sowie dem zentralen Nervensystem im Zusammenhang der Nahrungsmittelallergie ist in Abbildung 1.5. schematisch dargestellt. Gelangt ein Antigen in den Gastrointestinaltrakt, so wird es dort mit Zellen des Immunsystems konfrontiert. Im Fall der klassischen Nahrungsmittelallergie kommt es – bei vorangegangener Sensibilisierung (siehe 1.3.) - zu einer Bindung dieses Antigens an membranständige Immunglobuline auf der Oberfläche von Mastzellen und de-

1. Einleitung

ren Degranulation. Dadurch werden verschiedene präformierte und de novo gebildete Mediatoren freigesetzt, darunter Histamin und Mastzellproteasen (siehe 1.3. und 1.4.).

Die freigesetzten Mediatoren können zum einen direkt an Effektororganen, wie beispielsweise Drüsen oder Blutgefäßen, wirken, es sind zum anderen jedoch auch, wie oben bereits erwähnt, neuronal vermittelte Effekte beschrieben. Histamin, einer der zentralen Mastzellmediatoren, kann durch direkte Stimulation von Darmepithelzellen der Mukosa von Meerschweinchen (Wang et al. 1990) und Ratten (Schultheiss et al. 2006) eine Sekretion von Chloridionen hervorrufen. Vergleichbare Wirkungen auf die Sekretion sind für Mastzellproteasen beschrieben (Ikehara et al. 2010). Verschiedene Studien weisen jedoch darauf hin, dass es auch zu neuronal vermittelten Effekten an Muskulatur, Drüsen oder Blutgefäßen kommt (Wood 1991). Studien mit sensibilisierten Tieren konnten eine neuronale Beteiligung an sekretorischen Epitheleffekten bei Darmpräparationen aus dem Kolon von Meerschweinchen und Ratten aufzeigen (siehe oben). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Degranulation von isolierten humanen intestinalen Mastzellen enterische Neurone des Menschen und auch des Meerschweinchens stimuliert (Schemann et al. 2005).

Die Wirkung von Histamin am Kolon des Meerschweinchens wurde bereits genauer charakterisiert. Wang et al. zeigten in ihrer Studie von 1990 nicht nur die direkte Wirkung auf Epithelzellen, sondern auch einen partiell neuronal vermittelten Effekt. Drei Jahre später wurden Histaminrezeptoren auf submukösen Neuronen des Meerschweinchens nachgewiesen (Frieling et al. 1993). Über die Wirkung von Histamin auf submuköse Neurone der Ratte liegen bisher jedoch keine Daten vor. Aus diesem Grund stellte die Charakterisierung der Wirkung von Histamin auf Neurone aus dem Plexus submucosus von Ratten die zentrale Fragestellung meiner Arbeit dar.

1. Einleitung

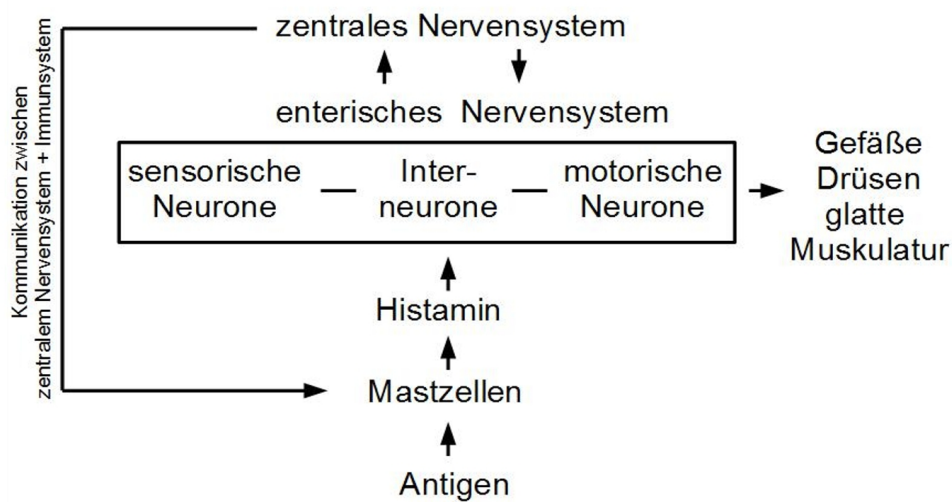


Abbildung 1.5. Schema der Kommunikation zwischen enterischem Nervensystem, zentralem Nervensystem und Immunsystem. Gelangen Antigene in den Gastrointestinaltrakt, reagiert das Immunsystem, nach vorangegangener Sensibilisierung, mit Mastzelldegranulation. Die freigesetzten Mediatoren, in erster Linie Histamin, wirken nun zum einen direkt auf die verschiedenen Effektororgane, zum anderen auf Neurone des enterischen Nervensystems (ENS). Das ENS steht im Informationsaustausch mit dem zentralen Nervensystem (ZNS), ist jedoch dazu in der Lage auch autonom zu reagieren. Die enterischen Neurone können verschiedene Wirkungen der Mediatoren, wie zum Beispiel Vasodilatation, vermehrte Drüsensekretion und Kontraktion der glatten Muskulatur vermitteln. Die Pfeile stellen die Richtung des Informationsflusses dar. Abbildung nach Wood 1991.

Obwohl das enterische Nervensystem in der Lage ist autonom zu agieren, ist es auch am Informationsaustausch mit dem zentralen Nervensystem beteiligt. Das zentrale Nervensystem hat außerdem die Möglichkeit, auf Immunzellen im Darm, wie beispielsweise Mastzellen, einzuwirken, indem vagale Nervenendigungen genutzt werden, die eine Degranulation induzieren können (Buhner und Schemann 2012). Außerdem ist eine Wirkung von CRF (corticotropin releasing factor) auf den Gastrointestinaltrakt im Zusammenhang mit Stress beschrieben. Es gibt Hinweise für die Signalübertragung von zentralen Neuronen zu intestinalen Mastzellen via CRF. Eine Studie mit kultivierten humanen intestinalen Mastzellen konnte nachweisen, dass diese Zellen Rezeptoren für CRF tragen und deren Aktivierung eine Freisetzung von Mastzellmediatoren hervorruft (Cao et al. 2005).

1. Einleitung

1.7. Histaminrezeptoren

Gegenstand meiner Arbeit war zunächst die Untersuchung des Effektes von Histamin als zentralem allergischem Mediator auf submuköse Neurone aus dem Kolon der Ratte. Es sind vier verschiedene Subtypen von Histaminrezeptoren in der Literatur beschrieben. Sie werden als H₁-, H₂-, H₃- und H₄-Rezeptoren bezeichnet. Bei allen Histaminrezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind membranständig und weisen sieben Transmembrandomänen, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, auf. Sie sind mit GTP-bindenden Proteinen, kurz G-Proteinen, assoziiert, die ihrerseits drei Untereinheiten besitzen, eine α -, eine β - und eine γ -Untereinheit. Es gibt verschiedene G-Proteine, die sich anhand ihrer Untereinheiten einteilen lassen. Durch Bindung von Histamin an den Histaminrezeptor kommt es zur Aktivierung des Rezeptors. Der aktivierte Rezeptor ist nun dazu in der Lage das gebundene G-Protein zu aktivieren. Ziel der Aktivierung des G-Proteins ist der Beginn der Signalübermittlung ins Zellinnere. G-Proteine sind für die weitere Signaltransduktion verantwortlich, je nach Untereinheit werden weitere Proteine aktiviert oder inhibiert. Häufig kommt es zur Aktivierung von Enzymen, die dann ihrerseits die Bildung eines sekundären Botenstoffs (second messenger) bedingen. Für die Wirkung von Histamin ist besonders häufig ein G_{q/11}-Protein-gekoppelter Signalweg beschrieben. Bei Bindung an den Rezeptor wird das G-Protein aktiviert und stimuliert daraufhin die Phospholipase C (PLC). Hierbei handelt es sich um ein Enzym, welches Lipide aus der Zellmembran spaltet. Aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) entstehen auf diesem Weg Diacylglycerin (DAG) sowie der second messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). IP₃ bindet an spezifische IP₃-Rezeptoren in der Membran von intrazellulären Calciumspeichern und bewirkt eine Freisetzung von Ca²⁺ aus diesen Speichern ins Zytosol. Die freigesetzten Calciumionen aktivieren gemeinsam mit DAG ein weiteres Enzym, die Proteinkinase C, welche für die Phosphorylierung von Proteinen zuständig ist.

1. Einleitung

1.8. Fragestellung

Da in der Literatur keine Daten zur Wirkung von Histamin auf submuköse Neurone der Ratte vorliegen, stand die Charakterisierung des Effektes dieses allergischen Mediators auf Neurone aus dem Plexus submucosus der Ratte im Vordergrund der Arbeit. Des Weiteren sollten die Interaktionen zwischen diesen Neuronen und Mastzellen als wichtige Komponenten des Immunsystems im Kontext der Nahrungsmittelallergie untersucht werden.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Effekt löst Histamin an Neuronen aus dem Plexus submucosus der Ratte aus?
- Welche Rolle spielt der klassische PLC-IP₃-Ca²⁺-Signalweg nach der Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren bei der Antwort auf Histamin?
- Welche Histaminrezeptor-Subtypen werden von submukösen Neuronen der Ratte exprimiert?
- Welchen Effekt übt Histamin auf das Membranpotential submuköser Neurone aus?
- Können submuköse Neurone aus dem Kolon der Ratte selbst Histamin synthetisieren?
- Kommt es zur Interaktion von submukösen Neuronen der Ratte mit Mastzellen in vitro?
- Welche der durch Degranulation freigesetzten Mastzellmediatoren sind an dem Effekt auf submuköse Neurone beteiligt?
- Welchen Effekt löst die Gabe von Ovalbumin bei Darmpräparaten von Ratten, welche zuvor gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden, aus?
- Welche Mastzellmediatoren sind an diesem Effekt von Ovalbumin beteiligt?
- Wirkt sich die Gabe von Ovalbumin bei Darmpräparaten von Ratten, welche zuvor gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden, auf die parazelluläre Permeabilität aus?

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten aus hauseigener Zucht des Instituts für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen genutzt. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Hell-dunkel-Rhythmus in Kleingruppen gehalten und bekamen Futter sowie Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt. Verwendet wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere mit einem Körpergewicht von 170 g – 350 g. Dies war dem Regierungspräsidium Gießen angezeigt bzw. wurde von diesem genehmigt (GI 18/2 105/2012).

2.2. Zelllinie

Für einen Teil der Experimente wurde mit der Zelllinie RBL-2H3 gearbeitet. Hierbei handelt es sich um eine permanente basophile leukämische Zelllinie aus der Ratte, welche freundlicherweise von Prof. Cavalié (Universität des Saarlandes, Homburg/Saar) zur Verfügung gestellt wurde. Die Zelllinie RBL-2H3 stellt ein Mastzelläquivalent dar, welches Mastzellmediatoren synthetisiert und freisetzen kann (Kulczycki et al. 1974, Barsumian et al. 1981).

2.3. Lösungen

2.3.1. Lösungen für die Präparation sowie für die funktionellen Experimente

2.3.1.1. Bicarbonatgepufferte Parsons-Lösung

Diese Pufferlösung (Parsons und Paterson 1965), die für einen Teil der Präparationsschritte sowie für die Ussingkammer-Experimente Verwendung fand, enthielt folgende Substanzen (Angaben in mmol/l): 107 NaCl, 4,5 KCl, 25 NaHCO₃, 1,8 Na₂HPO₄, 0,2 NaH₂PO₄, 1,25 CaCl₂, 1 MgSO₄, 12,2 Glucose. Die Lösung wurde mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast und mit NaHCO₃ bzw. HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2. Material und Methoden

2.3.1.2. Tyrode

Die Präparation der Submukosapräparate, die Ca^{2+} -Imaging-Experimente und die Mikroelektroden-Ableitungen erfolgten in Tyrode. Die Tyrode wurde täglich frisch hergestellt und bestand aus (Angaben in mmol/l): 135 NaCl, 5,4 KCl, 10 HEPES, 12,2 Glucose, 1 CaCl_2 , 1 MgCl_2 . Die Lösung wurde durch Zugabe von NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.3.1.3. Ca^{2+} -freie Tyrode

Hierbei handelte es sich um eine Tyrode, bei deren Herstellung kein CaCl_2 zugesetzt wurde. Ein zusätzlicher Calciumchelator wurde nicht verwendet.

2.3.1.4. Na^+ -freie Tyrode

Um diese Lösung herzustellen wurde NaCl durch D(-)-N-Methylglucamin (NMDG) ersetzt. Die Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch hergestellt und enthielt folgende Substanzen (Angaben in mmol/l): 140 NMDG, 5,4 KCl, 10 HEPES, 12,2 Glucose, 140 HCl, 1,25 CaCl_2 , 1 MgCl_2 . Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) bzw. HCl auf 7,4 eingestellt.

2.3.1.5. Färbelösung mit Fura-2-AM und Pluronic Acid

1 mg Fura-2-AM (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) wurde in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, in Aliquote geteilt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Färbelösung, welche zum Aufladen der intakten Gewebepreparate für die Ca^{2+} -Imaging-Messungen sowie die Mikroelektroden-Ableitungen verwendet wurde, wurde an jedem Versuchstag frisch angesetzt, sie bestand aus Tyrode, der Fura-2-AM (6 $\mu\text{mol/l}$) und Pluronic Acid (0,12 %, Vol/Vol; Life Technologies) zugesetzt wurden.

Die Herstellung der Lösung, welche zum Anfärben der kultivierten Zellen verwendet wurde, erfolgte analog, die Konzentrationen von Fura-2-AM (3 $\mu\text{mol/l}$) und Pluronic Acid (0,06 %, Vol/Vol) waren jedoch geringer.

2. Material und Methoden

2.3.2. Lösungen für die Zellkulturen

2.3.2.1. Präparationslösung

Die Isolation der Submukosa sowie ihre manuelle Zerkleinerung zur Herstellung einer primären Zellkultur erfolgte in Hank's balanced salt solution ohne Ca^{2+} und ohne Mg^{2+} (Life Technologies) mit einem Zusatz von Glucose (12,2 mmol/l).

2.3.2.2. Enzymatische Digestionslösung

Um die isolierte und manuell zerkleinerte Submukosa zu verdauen, wurde eine enzymatische Digestionslösung eingesetzt, die aus Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier Hank's balanced salt solution bestand, der Glucose (12,2 mmol/l), HEPES (10 mmol/l) sowie Collagenase II (1,8 mg/ml; Biochrom, Berlin, Deutschland) zugesetzt wurden.

2.3.2.3. Neurobasal-A-Medium zur Kultivierung der primären Submukosa-Kultur

Die primären Zellkulturen aus isolierter Submukosa des Kolons der Ratte wurden in folgendem Medium kultiviert: Neurobasal™-A-Medium (Life Technologies), dem fetales Kälberserum (10 %, Vol/Vol; PAA, Cölbe, Deutschland), Penicillin (100 units/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml; PAA) und Glutamin (0,5 mmol/l; PAA) zugesetzt wurden.

2.3.2.4. MEM α -Medium zur Kultivierung der RBL-2H3-Zellen und der Co-Kultur

Zellen der Linie RBL-2H3 wurden in MEM α -Medium (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) kultiviert, dem fetales Kälberserum (15 %, Vol/Vol; PAA), Penicillin (100 units/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) sowie Glutamin (2 mmol/l) zugesetzt wurden.

2.3.2.5. Einfriermedium der RBL-2H3-Zellen

Das Medium, welches zum Einfrieren der RBL-2H3-Zellen verwendet wurde, bestand aus MEM α -Medium, dem DMSO (10 %, Vol/Vol) zugesetzt wurde.

2. Material und Methoden

2.3.3. Lösungen für die immunzytochemischen Markierungen

2.3.3.1. Phosphatpuffer (PB)

Für die Herstellung der Fixierungslösung sowie der Lösung zum Anfärben der Zellkerne mit DAPI wurde ein Phosphatpuffer folgender Zusammensetzung verwendet (Angaben in mmol/l): 80 Na_2HPO_4 , 20 NaH_2PO_4 . Die Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst und mit NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.3.3.2. Phosphatpuffersalzlösung (PBS-Lösung)

Die Lösung zur Durchführung des Großteils der Waschschrte bei der Herstellung von indirekten Fluoreszenzmarkierungen bildete eine Lösung aus Phosphatpuffersalz (PBS). PBS wurde in Form von Tabletten verwendet, 1 Tablette PBS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde in 200 ml destilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Die entstandene Lösung wies eine Konzentration von 100 mmol/l auf. Sie wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und konnte etwa eine Woche lang genutzt werden.

2.3.3.3. Triton-X-100-haltige PBS-Lösung

Diese Lösung bildete die Basis für die Herstellung von Blockierungslösung sowie Antikörperlösungen. Die Triton-X-100-haltige PBS-Lösung bestand aus PBS-Lösung, der 0,05 % Triton-X-100 (Vol/Vol) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) als Detergens zugesetzt wurde. Diese Lösung wurde für die Waschschrte nach der Inkubation mit den Primärantikörperlösungen und vor Beschichtung mit den Sekundärantikörperlösungen verwendet.

2.3.3.4. Fixierungslösung

Zur Fixierung der Zellkulturen wurde eine 4 %ige (Gew/Vol) Paraformaldehydlösung hergestellt. Aufgrund der Toxizität von Paraformaldehyd erfolgten alle Arbeitsschrte unter dem Abzug. 4 g Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden unter ständigem Rühren bei 55°C in 100 ml Phosphatpuffer gelöst. Um eventuelle Partikel zu entfernen, wurde die Lösung gefiltert, bevor sie lichtgeschützt bei 4°C für maximal 2 Wochen aufbewahrt wurde.

2. Material und Methoden

2.3.3.5. Blockierungslösung

Die Blockierungslösung wurde aus Triton-X-100-haltiger PBS-Lösung hergestellt, der Eselserum (10 %, Vol/Vol; Millipore, Schwalbach, Deutschland) zugesetzt wurden.

2.3.3.6. Primärantikörperlösungen

Die Primärantikörperlösungen bestanden aus Blockierungslösung, welcher der jeweilige primäre Antikörper zugesetzt wurde. Die genauen Bezeichnungen sowie die Konzentrationen der primären Antikörper sind in Tabelle 2.1. aufgeführt.

2.3.3.7. Sekundärantikörperlösungen

Die Sekundärantikörperlösungen bestanden aus Triton-X-haltiger PBS-Lösung (0,05 % Triton-X, Vol/Vol), welcher der jeweilige sekundäre Antikörper zugesetzt wurde. Die genauen Bezeichnungen sowie die Konzentrationen der sekundären Antikörper sind in Tabelle 2.2. aufgeführt.

2.3.3.8. Lösung zur Kernfärbung

Zur Darstellung der Zellkerne in indirekten Immunfluoreszenzmarkierungen wurde der Farbstoff DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat) verwendet. Zunächst wurde eine Stammlösung aus DAPI (10 mg; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und destilliertem Wasser (2 ml) hergestellt. Die Gebrauchslösung (300 nmol/l) bestand aus dieser Stammlösung und Phosphatpuffer. Sie wurde bei 4°C gelagert und konnte maximal 6 Monate lang verwendet werden.

2.4. Wirkstoffe

Folgende Wirkstoffe wurden für die funktionellen Experimente, das heißt für die Ca^{2+} -Imaging-Messungen und die Ussingkammer-Messungen, verwendet:

Amthamin (Tocris, Bristol, Großbritannien), Cimetidin, Compound 48/80, Gadoliniumchlorid, Histamin, Indometacin, Manganchlorid, Pyrilamin, R- α -Methylhistamin (Biotrend, Wangen, Schweiz), Tetrodotoxin, Thioperamid (Biotrend, Wangen, Schweiz), Thrombin (Millipore, Schwalbach, Deutschland), Trifluoromethylphenylhistamin

2. Material und Methoden

(TMPH) (freundlicherweise überlassen von Prof. Schunack, FU Berlin) sowie Trypsin konnten in wässriger Lösung direkt im Messpuffer, Tyrode bzw. Parsons-Lösung, gelöst werden.

Für folgende Substanzen wurde zunächst eine Stocklösung bestehend aus Dimethylsulfoxid und Wirkstoff angesetzt: 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB), BW A4C (Wellcome, Beckenham, Großbritannien), Cyclopiazonsäure (Alexis, Grünberg, Deutschland), FR 171113 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), GB 83 (Axon, Groningen, Niederlande) und Veratridin. Die maximale Konzentration von DMSO in der Messkammer wurde beim Einsatz von 2-APB erreicht, sie betrug 0,29 % (Vol/Vol). Indometacin wurde in Ethanol gelöst. Die maximale Ethanolkonzentration in der Messkammer betrug 0,13 % (Vol/Vol).

Die bei der Durchführung der Versuche eingesetzten Wirkstoffe wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

2.5. Präparation

2.5.1. Präparation der Submukosa-Mukosa-Präparate für die Ussingkammer-Messungen

Die Ratten wurden mittels Genickschlag betäubt. Zur Tötung erfolgte zunächst eine zervikale Dislokation. Danach wurde die Bauchhöhle entlang der Linea alba eröffnet, gefolgt von einer Brusthöhleneröffnung entlang des Sternums. Nun erfolgte ein Herzschnitt, welcher zum Entbluten der Tiere führte (vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt). Das distale Ende des Kolons, welches durch einen großen Lymphknoten markiert ist (Lindström et al. 1979), wurde aufgesucht und mit der Schere abgesetzt. Das Kolon wurde auf seiner gesamten Länge vorsichtig stumpf vom Mesenterium getrennt und an seinem proximalen Ende, kurz vor seinem Übergang ins Caecum, ebenfalls mit der Schere abgesetzt. Das Kolon wurde nun in eiskalte, mit Carbogen begaste Parsons-Lösung (siehe 2.3.1.1.) überführt, bis es zu einer Relaxation der Muskelschicht kam. Durch mehrmaliges Spülen des Lumens mit eiskalter Parsons-Lösung wurden Kotreste entfernt und das Gewebe konnte nun auf einen Kunststoffstab (Durchmesser 5 mm) aufgezogen werden. Am distalen Kolonende wurde mit einem stumpfen Skalpell eine umlaufende Inzision gesetzt, bei der die Muskelschicht und die darauf liegende

2. Material und Methoden

Serosa durchtrennt wurden. Anschließend konnte die Muskelschicht, inklusive der auf ihr sitzenden Serosa, vorsichtig über die gesamte Kolonlänge abgezogen werden. Die Muskelschicht wurde verworfen, das übrige Kolon, bestehend aus Submukosa sowie Mukosa, verblieb zunächst auf dem Stab. Der proximale Teil des Kolons, welcher an den quer verlaufenden Schleimhautfalten der Mukosa erkannt werden konnte (Lindström et al. 1979), wurde abgeschnitten, das verbliebene distale Kolon wurde auf dem Stab mit einem Skalpell in 2 Hälften geteilt. Jedes dieser so entstandenen Submukosa-Mukosa-Präparate wurde entlang des Mesenterialansatzes eröffnet und in eine Ussingkammer eingespannt.

2.5.2. Präparation der Jejunumsegmente für die Ussingkammer-Messungen

Im Anschluss an die Entnahme des Kolons wurde der Magen der Ratte aufgesucht. Etwa 20 cm distal des Pylorus wurde das Jejunum mit der Schere abgesetzt, in distaler Richtung durch stumpfe Präparation vom Mesenterium abgelöst und bei einer Länge von ca. 10 cm ebenfalls mit der Schere abgesetzt. Das entnommene Jejunum wurde in eiskalte Parsons-Lösung (siehe 2.3.1.1.) verbracht, damit die Muskelschicht relaxieren konnte. Das Lumen wurde durch mehrmaliges Spülen mithilfe einer mit Parsons-Lösung gefüllten Spritze gereinigt und der Darm konnte danach auf einen Kunststoffstab (Durchmesser 5 mm) aufgezogen werden. Das Jejunum wurde nun in zwei Segmente mit einer Länge von etwa 3 cm geteilt, jedes Präparat am Mesenterialansatz mit einem Skalpell eröffnet und in eine Ussingkammer eingespannt. Die Muskelschicht wurde bei der Anfertigung der Jejunumsegmente also nicht entfernt.

2.5.3. Präparation der Submukosa für Ca^{2+} -Imaging-Experimente und Mikroelektroden-Messungen

Um die isolierte Submukosa aus dem Kolon der Ratte zu erhalten, wurde mit dem Submukosa-Mukosa-Präparat (vergleiche 2.5.1) weitergearbeitet (siehe Abbildung 2.1.). Das Submukosa-Mukosa-Präparat wurde noch auf dem Kunststoffstab der Länge nach am Mesenterialansatz mittels Skalpell eröffnet. Danach konnte es vom Stab gelöst und mit der Mukosa nach oben auf einer Glasplatte ausgebreitet werden. Das Präparat wurde

2. Material und Methoden

mit Tyrode (siehe 2.3.1.2.) umspült, um ein Austrocknen des Gewebes zu vermeiden. Das Gewebe wurde am proximalen Ende mit einem Objektträger und einer Klammer an der Glasplatte fixiert. Nun wurde die Mukosa mithilfe von zwei Objektträgern vorsichtig von der Submukosa abgetrennt. Dazu wurde das Gewebe am distalen Ende mit einem Objektträger leicht gespannt, mit dem anderen Objektträger erfolgte eine vorsichtige Inzision, um die Mukosa, nicht jedoch die Submukosa zu durchtrennen. Danach konnte die Mukosa als intakte Schicht vorsichtig mithilfe des Objektträgers von der darunter liegenden Submukosa getrennt werden. Die isolierte Submukosa wurde nun mit dem Skalpell in Quadrate mit 1 cm Kantenlänge geschnitten und mithilfe zweier Pinzetten auf die bereits zuvor beschichteten Glasplättchen (Durchmesser 20 mm) bzw. Zellkulturschalen (Durchmesser 35 mm) (vergleiche 2.7.) geklebt.

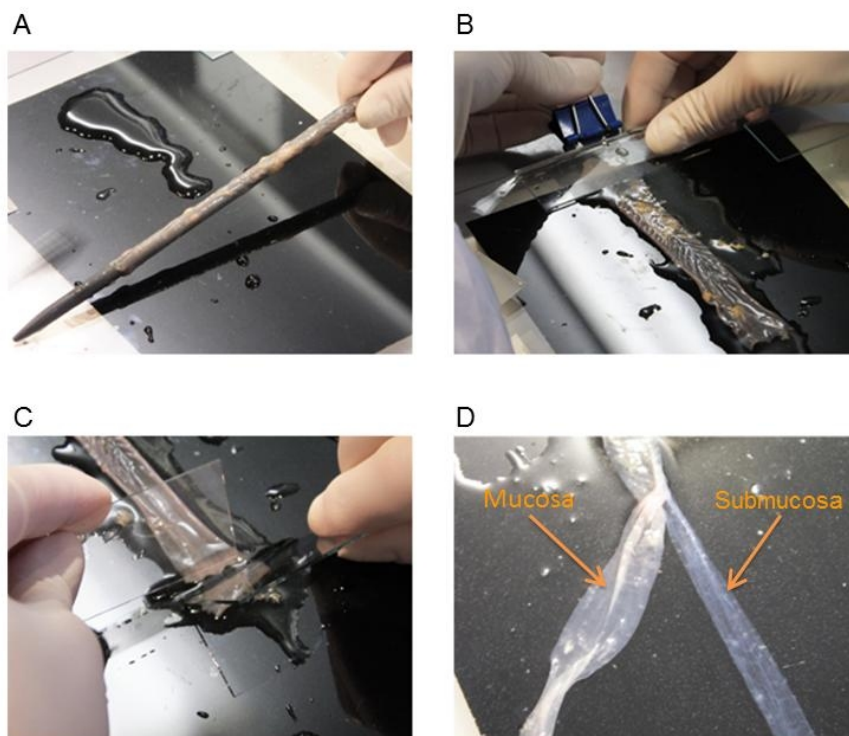


Abbildung 2.1. A: Submukosa-Mukosa-Präparat auf dem Kunststoffstab, B: eröffnetes Submukosa-Mukosa-Präparat, C: Trennung von Submukosa und Mukosa, D: Submukosa und Mukosa liegen getrennt vor. (Bilder mit freundlicher Genehmigung von S. Bader)

2. Material und Methoden

2.6. Zellkultur

2.6.1. Primäre Zellkultur der Submukosa aus dem Kolon der Ratte

2.6.1.1. Kulturbedingungen der primären submukösen Zellkultur

Die Zellen wurden im Brutschrank (Sanyo CO₂ Incubator, SANYO North America Corporation, Wood Dale, IL, USA) bei 37 °C und 5 % CO₂ (Vol/Vol) in Neurobasal-A-Medium (siehe 2.3.2.3.) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte am ersten Tag nach der Präparation, um möglichen Zelldetritus zu entfernen sowie den Zellen neue Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sterilbank (LaminAir LB-48-C, Heraeus, Hanau, Deutschland).

Die Zellen konnten zwar bis zu fünf Tage lang kultiviert werden, allerdings proliferierten die submukösen Zellen, wie z.B. Fibroblasten, so stark, dass es ab Tag 4 zu einer Überwucherung der submukösen Neurone kam und diese sich in Ca²⁺-Imaging-Experimenten nicht mehr adäquat untersuchen ließen. Aus diesem Grund wurden die Zellen, die für die Experimente genutzt wurden, nur zwei bis drei Tage lang im Brutschrank kultiviert.

2.6.1.2. Herstellung der primären submukösen Zellkultur

Um eine primäre Zellkultur der Submukosa und damit auch der Neurone des Plexus submucosus herzustellen, wurde zunächst die Submukosa aus dem Kolon der Ratte, wie in 2.5.3. beschrieben, in Präparationslösung (siehe 2.3.2.1.) isoliert. Die Submukosa wurde nun mit einem Skalpell manuell zerkleinert, bis die Größe der Einzelteile etwa 2 – 3 mm betrug. Die Submukosasegmente wurden mit einer Pipette aufgesammelt und in einem Tube (Fassungsvermögen 2 ml) für 10 Sekunden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand an Präparationslösung abgenommen und durch 2 ml enzymatische Digestionslösung (siehe 2.3.2.2.) ersetzt.

Zum Kollagenaseverdau des Gewebes wurde das Tube in einen Thermomixer verbracht (HLC MHL-23, Ditabis, Pforzheim, Deutschland) und dort bei 200 Schüttelbewegungen pro Minute und 37 °C inkubiert. Das Schütteln sollte die Verteilung der Kollagenase sowie die Dissoziation des Gewebes erleichtern. Nach 30 Minuten wurde das Gewebe manuell weiter zerkleinert, indem es durch eine Kanüle mit dem Durchmesser 21 G dreimal in eine Spritze aufgesogen und wieder herausgedrückt wurde. Nach einer weite-

2. Material und Methoden

ren Inkubation in Kollagenase für 30 min erfolgte eine Trituration in einer 23-G- und nach weiteren 30 min in einer 27-G-Kanüle. Die Präparation war erfolgreich, wenn eine homogen trübe Lösung entstanden war. In Ausnahmefällen musste die Inkubation noch einige Minuten fortgesetzt werden, um dies zu erreichen. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute. Der Überstand wurde abgenommen und durch 2 ml Neurobasal-A-Medium (siehe 2.3.2.3.) ersetzt. Nach kurzem Durchmischen von Zellpellet und Medium mittels Vortexmischer wurde die Zellsuspension erneut für drei Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen.

Welches Volumen an frischem Neurobasal-A-Medium nun zum Zellpellet hinzupipettiert wurde, richtete sich nach der Anzahl der vorbereiteten, Poly-L-Lysin beschichteten, Glasplättchen (vergleiche 2.7.) sowie der Größe des Zellpellets. Die Präparation einer isolierten Submukosa einer Ratte mit 200 - 250 g Körpergewicht ergab ein Zellpellet, welches in 400 µl Neurobasal-A-Medium resuspendiert wurde. Je 50 µl dieser Zellsuspension wurden mittig auf jedes vorbereitete Glasplättchen, welches sich in einer Vertiefung einer Vier-Well-Platte befand, pipettiert. Ein abweichendes Körpergewicht der genutzten Ratte führte zur individuellen Anpassung der Mediummenge. Die mit den beladenen Glasplättchen gefüllten Vier-Well-Platten wurden dann für 2 Stunden im Brutschrank gelagert, um den Zellen zu ermöglichen herabzusinken und am Glasplättchen anzuhaften. Nach diesen 2 Stunden wurde jedes Well mit 37°C warmem Neurobasal-A-Medium auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt.

2.6.2. Zelllinie RBL-2H3

2.6.2.1. Kulturbedingungen

Die Zellen der Zelllinie RBL-2H3 wurden in Zellkulturschalen (Durchmesser 6 cm) im Brutschrank (TECO10, MS-L GmbH, Dielheim, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ (Vol/Vol) in MEM α -Medium (siehe 2.3.2.4.) kultiviert. Alle Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter einer Sterilbank (LaminAir LB-48-C) durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.6.2.2. Auftauen der Zellen

Die freundlicherweise von Prof. Cavalié (Universität des Saarlandes, Homburg/Saar) zur Verfügung gestellten Kryos wurden zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und der Inhalt des Kryoröhrchens wurde in 10 ml MEM α -Medium überführt. Beide Teile wurden in einem Falcon Tube (15 ml Fassungsvermögen) zunächst vermischt und dann für 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen, und das entstandene Zellpellet in 8 ml frischem MEM α -Medium gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde auf zwei Zellkulturschalen verteilt und zusätzlich 2 ml frisches MEM α -Medium hinzu pipettiert, sodass jede Zellkulturschale mit einem Volumen von 6 ml gefüllt war. Die beladenen Zellkulturschalen wurden im Brutschrank inkubiert.

2.6.2.3. Passagieren der Zellen

Aufgrund des schnellen Wachstums der RBL-2H3-Zellen wurden diese dreimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium von der bewachsenen Kulturschale entfernt und diese dreimal mit je 1 ml PBS-Lösung (PAA, Cölbe, Deutschland) gewaschen, um Rückstände des Mediums zu entfernen. Daraufhin wurde 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (PAA, Cölbe, Deutschland) auf den Zellrasen gegeben und für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, um die Zellen vom Boden der Kulturschale abzulösen. Nach der Inkubation im Brutschrank wurde der Teil der Zellen, welcher noch immer am Schalenboden haftete, durch Klopfen auf denselben gelöst.

Durch Zugabe von 1 ml MEM α -Medium entstand eine Zellsuspension, deren Menge an Zellen pro Volumeneinheit nun mittels Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch ermittelt werden konnte. Es wurden je 60.000 Zellen in zwei frische Zellkulturschalen überführt, das Volumen der Zellsuspension wurde durch Zugabe von MEM α -Medium auf 6 ml pro Zellkulturschale gebracht. Die frisch beladenen Zellkulturschalen wurden in den Brutschrank gestellt und bei den bereits oben beschriebenen Bedingungen bis zur Nutzung bzw. bis zum nächsten Passagieren inkubiert. Die Erfahrung zeigte, dass sich im Schnitt ca. 230 Zellen in jedem Mikroliter Zellsuspension befanden, sodass aus Gründen der Zeitersparnis beim Passagieren letztlich auf das Zählen der Zellen verzichtet werden konnte und pauschal 250 μ l Zellsuspension in jede frische Zellkulturschale übertragen wurden.

2. Material und Methoden

Da vermutet wird, dass Zellen der RBL-Linie durch zu häufige Subkultivierung eine verminderte Histaminfreisetzung zeigen (Barsumian et al. 1981), wurden diese spätestens mit Passage 30 verworfen und im Anschluss zuvor eingefrorene Zellen (siehe 2.6.2.4.) nach dem oben beschriebenen Protokoll wieder aufgetaut.

2.6.2.4. Einfrieren der Zellen

Um einen Vorrat an RBL-2H3-Zellen zur Verfügung zu haben, wurden insgesamt zweimal Zellen der Passagen 10 bzw. 12 eingefroren. Hierzu wurde die beim Passagieren entstandene Zellsuspension folgendermaßen weiterverarbeitet: Nach dem Zählen der Zellen wurde die gesamte Zellsuspension für 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in einer entsprechenden Menge frisch hergestellten Einfriermediums (siehe 2.3.2.5.), welches DMSO enthielt, so gelöst, dass eine Zellsuspension mit 10^{12} Zellen pro ml Einfriermedium entstand. Es wurden je 0,5 ml dieser Zellsuspension in jedes Kryoröhrchen (Fassungsvermögen 2 ml) gefüllt. Danach wurden in jedes Kryoröhrchen nochmals 0,5 ml frisches Einfriermedium gefüllt, sodass in jedem Kryoröhrchen ein Gesamtvolumen von 1 ml und eine Zellzahl von 10^6 Zellen vorhanden waren. Die Röhrchen wurden in einem Einfriertopf (Kryo-Einfriergerät, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) bei -80°C eingefroren. Der genutzte Einfriertopf zeichnete sich durch die äußere Umspülung der Kryoröhrchen mit Isopropylalkohol aus, dadurch sollte eine Abkühlrate von 1°C pro Minute garantiert werden.

2.6.3. Co-Kultur aus kultivierten Zellen der Submukosa der Ratte und RBL-2H3-Zellen

2.6.3.1. Kulturbedingungen der Co-Kultur

Die Co-Kultur aus submukösen Neuronen und RBL-2H3-Zellen wuchs in MEM α -Medium. Beide Zelltypen wurden für ein bis zwei Tage gemeinsam im Brutschrank (Sanyo CO₂ Incubator) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2. Material und Methoden

2.6.3.2. Herstellung der Co-Kultur

Um die Co-Kultivierung submuköser Neurone aus dem Kolon der Ratte mit RBL-2H3-Zellen zu ermöglichen, wurde zunächst eine primäre Zellkultur der Submukosa nach dem oben beschriebenen Protokoll angelegt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sterilbank (LaminAir LB-48-C). Am ersten Tag nach der Präparation wurde zunächst das Neurobasal-A-Medium (siehe 2.3.2.3.) entfernt und durch MEM α -Medium (siehe 2.3.2.4.) ersetzt, da nur unter diesen Bedingungen ein gemeinsames Wachstum beider Zelltypen beobachtet werden konnte. Es erwies sich jedoch als wichtig, die primäre Zellkultur der Submukosa zunächst einen Tag in Neurobasal-A-Medium zu kultivieren, um den Neuronen die Möglichkeit zu geben, sich in optimaler Umgebung zu regenerieren und auszudifferenzieren. Unmittelbar nach dem Mediumwechsel wurde eine Zellkulturschale mit RBL-Zellen zunächst mit steriler PBS-Lösung gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA-Lösung beschichtet, um den Zellrasen von der Kulturschale zu lösen und eine Zellsuspension herzustellen. Dieses Vorgehen entspricht dem Prozedere beim Passagieren der Zellen und ist in 2.6.2.3. detailliert beschrieben. Nach lichtmikroskopischer Bestimmung der Zellzahl pro Volumen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer, wurden 10.000 Zellen in jedes Well der primären Zellkultur aus submukösen Neuronen übertragen.

2.7. Beschichtung der Glasplättchen sowie der Zellkulturschalen

Für die Ca²⁺-Imaging-Messungen mit isolierten Submukosae mussten zunächst Glasplättchen mit einem Durchmesser von 20 mm mit 50 μ l gebrauchsfertiger Poly-L-Lysin-Lösung (Molekulargewicht > 300000 D, 0,1 mg/ml; Biochrom, Berlin, Deutschland) beschichtet werden. Die verwendete Flüssigkeitsmenge wurde dabei mit der Pipettenspitze zunächst zu einem möglichst dünnen, großflächigen Film verteilt und dann auf einer Heizplatte bei 47 °C eingedampft. Die Beschichtung der Plättchen wurde zeitlich unmittelbar vor Beginn der Präparation vorgenommen.

Für die Herstellung der Submukosapräparate zur intrazellulären Mikroelektroden-Messung wurde auf die Nutzung von Glasplättchen verzichtet, um den Arbeitsabstand zwischen Objektiv und Gewebepräparat nicht zusätzlich zu vergrößern. Das Gewebe

2. Material und Methoden

wurde hierfür direkt auf Zellkulturschalen (Durchmesser 35 mm), welche gleichzeitig als Messkammern für die Versuche dienten, aufgeklebt. Zu diesem Zweck wurden hier direkt die Zellkulturschalen nach der für die Beschichtung der Glasplättchen bereits beschriebenen Vorgehensweise beschichtet.

Für die Ca^{2+} -Imaging-Experimente an kultivierten Zellen sowie die immunzytochemischen Färbungen wurden Glasplättchen von 13 mm Durchmesser unter einer Sterilbank (LaminAir) zunächst abgeflammt. Sie wurden mit 30 μl einer verdünnten (bestehend aus 1 Teil Poly-L-Lysin und vier Teilen destilliertem Wasser) Poly-Lysin-Lösung beschichtet.

2.8. Protokoll zur Immunisierung der Ratten mit Ovalbumin

Zur Untersuchung neuroimmuner Kommunikationen im Jejunum sowie Kolon der Ratte wurde ein Tierversuch durchgeführt, bei dem die 48 verwendeten Tiere zunächst gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden. Hierzu nutzte ich ein bekanntes Modell, welches bereits in der Literatur beschrieben wurde (Hug et al. 1996).

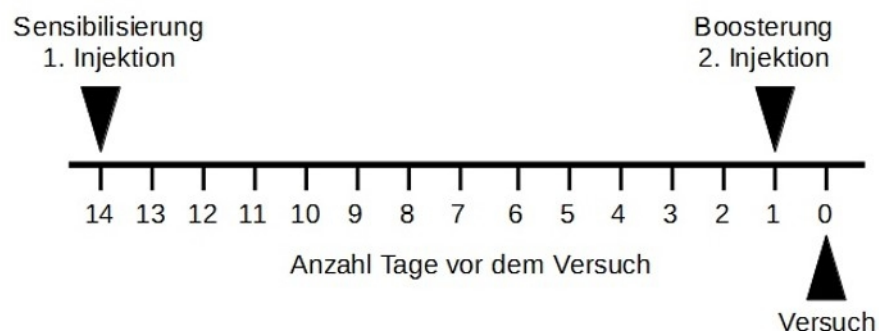


Abbildung 2.2. Schema zur Sensibilisierung der Ratten mit Ovalbumin

2. Material und Methoden

Die Tiere erhielten vierzehn Tage vor dem Versuch eine subkutane Injektion, bestehend aus 10 µg Ovalbumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), welches in 50 µl steriler 0,9 % (Gew/Vol) Kochsalzlösung (B.Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst wurde, sowie 60 µl des Adjuvans Stimune® (Prionics AG, Schlieren, Schweiz). Zur Boostierung wurde die Injektion mit einer Lösung gleicher Zusammensetzung einen Tag vor dem Versuch wiederholt. Jedes behandelte Tier wurde einer täglichen Adspektion unterzogen, es konnten jedoch keinerlei Krankheitsanzeichen infolge der Sensibilisierung gegen Ovalbumin entdeckt werden.

2.9. Ca²⁺-Imaging

2.9.1. Theorie des Ca²⁺-Imagings

Die Technik des Ca²⁺-Imagings ermöglicht den Nachweis neuronaler Aktivität durch die Darstellung sich verändernder zytosolischer Ca²⁺-Konzentrationen in der Zelle. Die bildliche Darstellung erfolgte hierbei mittels Indikatorfarbstoffen. Der Farbstoff Fura-2, der von mir genutzt wurde, gehört zur Gruppe der wellenlängenändernden Farbstoffe (wavelength shifting dyes). Solche Farbstoffe ändern durch die Bindung an Ca²⁺ ihre Anregungs- und/oder Emissionswellenlängen (Grynkiewicz et al. 1985). Im Falle von Fura-2 ändert sich mit der Ca²⁺-Bindung die optimale Wellenlänge, mit der das Molekül zur Fluoreszenz angeregt wird. Diese beträgt 362 nm für freies Fura-2 und 340 nm für den Ca²⁺-Fura-2-Komplex. Trotz des Anregungsmaximums bei 362 nm für ungebundene Fura-2 Moleküle wird in der Praxis bei einer Wellenlänge von 380 nm gemessen. Der Grund hierfür ist die Nähe des Anregungsmaximums von 362 nm zum sogenannten isoemissiven Punkt des Fura-2-spezifischen Spektralverhaltens. Der isoemissive Punkt beschreibt den Schnittpunkt der Anregungsspektren für die Ca²⁺-gebundene Form des Fura-2 und seine ungebundene Form (siehe Abbildung 2.3.). Das bedeutet, dass am isoemissiven Punkt die Fluoreszenzintensität unabhängig von der Ca²⁺-Konzentration immer gleich ist. Zur Darstellung sich verändernder Ca²⁺-Konzentrationen in der Zelle ist eine Messung bei 362 nm also ungeeignet.

2. Material und Methoden

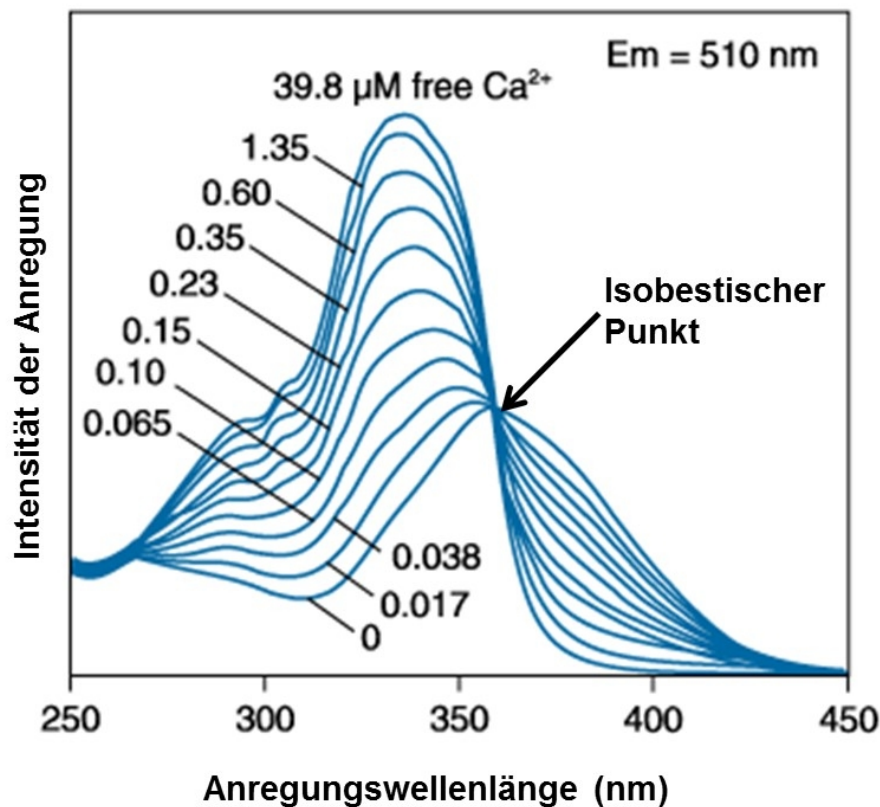


Abbildung 2.3. Anregungswellenlängen von Fura-2 (Abbildung nach Haugland 2005).

Abbildung 2.3. zeigt die Anregungsspektren für Ca²⁺-gebundenes und -ungebundenes Fura-2. Sie verdeutlicht, dass die Differenz der Fluoreszenzintensität für Ca²⁺-gebundenes Fura-2 und freies Fura-2 am größten ist, wenn die Messung der Fluoreszenz der freien Form bei einer Wellenlänge von 380 nm erfolgt. Das Maximum der emittierten Lichtstrahlung liegt - unabhängig davon ob die gebundene oder die freie Form des Farbstoffs Fura-2 vorliegt - immer bei 510 nm.

Da die maximale Anregung, je nachdem, ob die Ca²⁺-gebundene oder die freie Form vorliegt, bei unterschiedlichen Wellenlängen liegt, die Emission jedoch unveränderlich ist, sind Verhältnismessungen, sogenannte Ratiomessungen, möglich. Hierbei wird der Quotient aus der gemessenen Emission bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm und der Emission bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 380 nm gebildet. Dies bedeutet, dass es bei einem Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration auch zu einem Anstieg der Ratio kommt, fällt die Ca²⁺-Konzentration, so verringert sich auch der Wert

2. Material und Methoden

der Ratio. Die Ratiomessung hat den Vorteil, dass sie unabhängig von der absoluten Farbstoffkonzentration in der Zelle ist, außerdem spielen Unterschiede, die durch Zellgröße oder Zelldicke zustande kommen, keine Rolle mehr. Da es durch längere Belichtung zum Ausbleichen des Farbstoffs kommt, ist die Ratiomessung auch hier von Vorteil. Trotz des Ausbleichens des Farbstoffs bleibt durch die Verhältnismessung der berechnete Quotient für längere Zeit stabil (Tsien und Poeni 1986). Durch die Ratiomessung kann jedoch immer nur die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bestimmt werden, eine Ermittlung der absoluten Ca^{2+} -Konzentrationen findet nicht statt.

2.9.2. Fluoreszenzfarbstoff Fura-2

Fura-2 ist ein Fluoreszenz-Indikator-Farbstoff mit der Grundstruktur eines Calcium-Chelators, der sich durch hohe Selektivität für Calciumionen auszeichnet (siehe Abbildung 2.4.A). Die freie Säure des Farbstoffmoleküls trägt fünf Carboxylgruppen, von denen vier je ein Calciumion klauenartig umschließen können, sodass ein Komplex gebildet wird. Die fünfte Carboxylgruppe kann aufgrund seiner geringen Ladung kein Calciumion binden. Da es sich um ein geladenes Molekül handelt, kann es die Zellmembran nicht passieren. Aus diesem Grund wird Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) eingesetzt, bei dem alle Carboxylgruppen mit Acetoxymethylresten verestert sind (siehe Abbildung 2.4.B). In dieser lipophilen Form kann Fura-2-AM durch die Zellmembran in die Zelle diffundieren, es fluoresziert in dieser Form allerdings nicht mehr. Intrazellulär wird Fura-2-AM durch unspezifische Esterasen zu Fura-2, Formaldehyd und Acetat gespalten. Damit liegt nun freies Fura-2 intrazellulär vor, es kann Calciumionen komplexieren und hat seine Fähigkeit zur Fluoreszenz zurückerlangt. Da es in seiner geladenen Form vorliegt, kann es die Zelle nicht wieder verlassen. Auf diese Weise wird eine nicht-invasive Beladung der Zellen mit Farbstoff ermöglicht.

Die Bindungskurve von Ca^{2+} an den Farbstoff Fura-2 verläuft sigmoidal. Die Dissoziationskonstante K_d beschreibt den Wert, bei dem 50 % der vorhandenen Fura-2-Moleküle an Ca^{2+} gebunden vorliegen. Je kleiner K_d ausfällt, umso größer ist die Affinität des Zielions zu binden. K_d liegt für Fura-2 bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 224 nmol/l. Unter Ruhebedingungen liegt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in den meisten Zellen

2. Material und Methoden

nur bei etwa 100 nmol/l. Dies bedeutet, dass auch bei einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auf einen Stimulus hin noch genügend Spielraum besteht, bis eine Farbstoffsättigung eintritt.

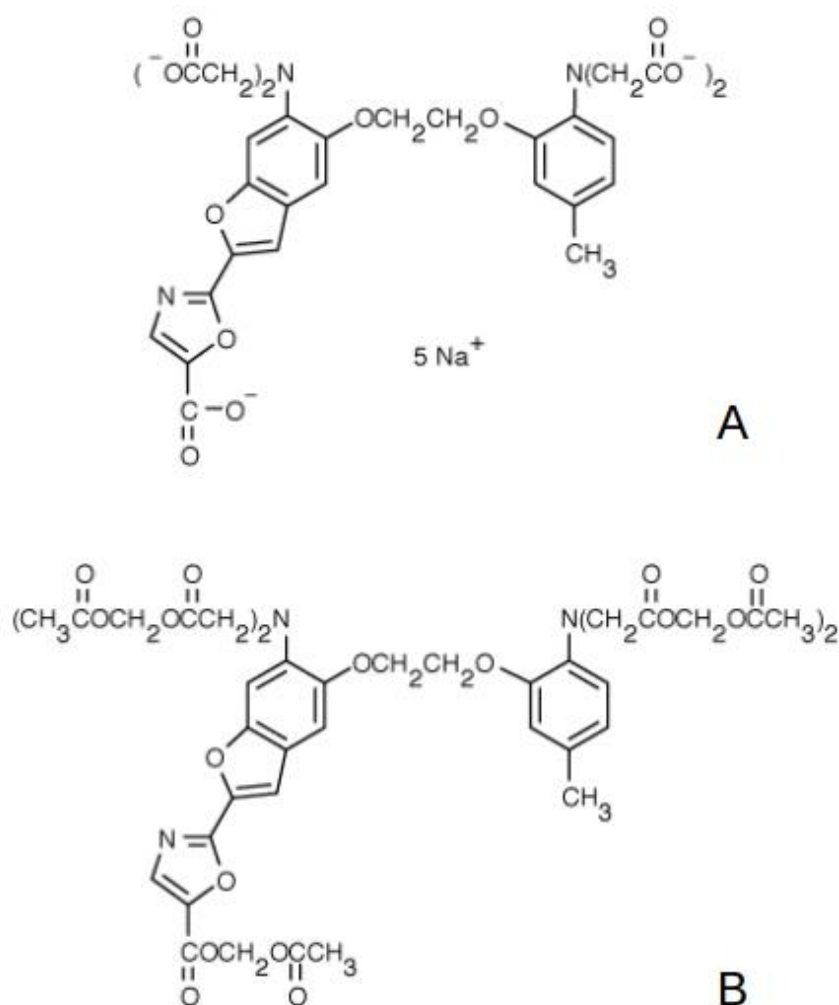


Abbildung 2.4. A: Strukturformel von Fura-2 (Natriumsalz)
 B: Strukturformel von Fura-2-AM (Quelle: *Life Technologies, Molecular Probes Handbook*)

2. Material und Methoden

2.9.3. Messstand

Die Imaging-Versuche wurden mit einem inversen Lichtmikroskop der Firma Olympus (IX 50; Olympus Optical, Tokyo, Japan) durchgeführt, ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung wurde für alle Messungen verwendet. Das Lichtmikroskop war sowohl mit einem Epifluoreszenz-Setup als auch mit einer Image-Analyse-Software (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) ausgestattet. Die Lichtquelle stellte eine Xenonlampe dar, welche Lichtwellen erzeugte, die über einen dichromatischen Spiegel und einen Lichtleiter auf das Präparat übertragen wurden. Die bei einer Anregungswellenlänge von 340 bzw. 380 nm entstehende Emission von 510 nm konnte den dichromatischen Spiegel passieren und wurde durch eine CCD-Kamera (CCD = charge coupled device) (Till Photonics) aufgenommen und auf einen Computer übertragen. Durch einen beweglichen Spiegel konnte das Licht, je nach Wunsch, entweder zum Okular oder zur Kamera weitergeleitet werden. Den schematischen Aufbau des Messstandes zeigt Abbildung 2.5..

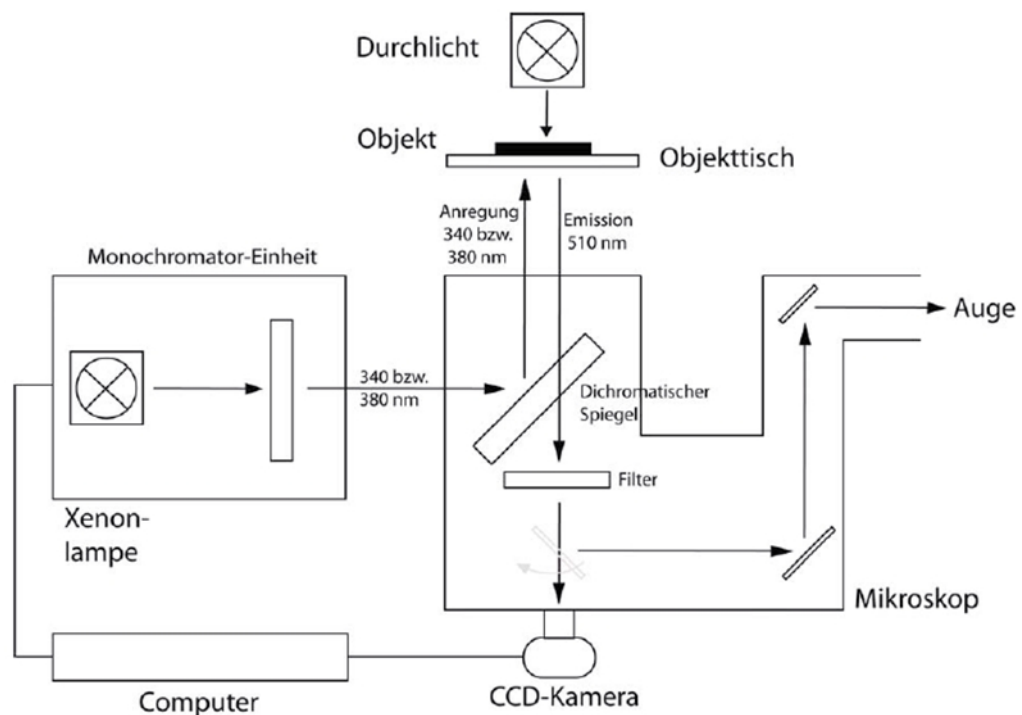


Abbildung 2.5. Schema des genutzten Messstandes für das Ca^{2+} -Imaging (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

2. Material und Methoden

2.9.4. Messkammer und Perfusionssystem

Die Messkammer bestand aus mehreren Komponenten. Die Basis bildete eine Metallplatte, die in der Mitte eine Aussparung für die jeweiligen Glasplättchen, auf denen sich die Präparate befanden, aufwies. Der Durchmesser der Aussparung war dabei jeweils 2 mm kleiner als der Durchmesser der verwendeten Glasplättchen. Die Glasplättchen wurden über die Aussparung gelegt und mit einem jeweils passenden Teflonring, der die gleiche Aussparung wie die Metallplatte besaß, befestigt. Der Teflonring wurde seinerseits befestigt, indem er auf Metallbolzen mit Gewinde, welche auf der Metallplatte befestigt waren, gesteckt wurde. Mit Muttern wurde der Teflonring an den Metallbolzen festgeschraubt. Die Aussparung des Teflonrings war kegelförmig. Mittig an der Aussparung war der Teflonring lediglich wenige Millimeter hoch, nach außen hin wurde er immer höher, sodass eine Kammer entstand. Diese Kammer konnte, je nach Größe der Aussparung, mit einem Volumen von 2 ml bzw. 3 ml Messpuffer gefüllt werden.

Die gesamte Messkammer konnte auf dem Objekttisch des Mikroskops befestigt werden, indem sie in die dafür vorgesehene Halterung einrastete. War die Kammer fixiert, wurde sie im nächsten Schritt an ein Perfusionssystem angeschlossen, welches durch eine Schlauchpumpe (11OSC.G18.CH5B; Ole Dich Instrumentsmakres APS, Hvidovre, Dänemark) angetrieben wurde. Durch die angeschlossene Schlauchpumpe waren Zulauf und Ablauf stets identisch. Alle Experimente wurden bei einem Flüssigkeitsaustausch von 2,5 ml/min durchgeführt.

2.9.5. Versuchsdurchführung

Zum Aufladen der Zellen mit Farbstoff wurden die Gewebe- bzw. Zellkulturpräparate für eine bis zwei Stunden mit 250 µl der jeweiligen Färbelösung (siehe 2.3.1.5.) je Plättchen beschichtet. Dieser Schritt sowie alle folgenden Schritte fanden unter Lichtschutz statt, um ein frühzeitiges Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern. Das in der Färbelösung vorhandene Detergens Pluronic Acid wurde verwendet, um die Löslichkeit von Fura-2-AM zu verbessern. Die Glasplättchen mit den aufgeladenen Präparaten wurden nach der Inkubationszeit in die Messkammer eingespannt, mit Tyrode (siehe 2.3.1.2.) überschichtet und auf dem Objekttisch befestigt (siehe 2.9.4.). Das Perfusionssystem wurde nun an der Messkammer befestigt, mit Tyrode befüllt und sofort gestartet, um

2. Material und Methoden

überschüssigen Farbstoff, der nicht von den Zellen aufgenommen worden war, bereits vor Beginn der Messung zu entfernen. Die Perfusion bereits vor Auswahl des Messbereichs zu starten hatte außerdem den Vorteil, dass nach Festlegung des Messbereichs keine Manipulation an der Messkammer mehr vorgenommen werden musste und eine dadurch verursachte Verschiebung des Messbereichs ausgeschlossen werden konnte.

Im nächsten Schritt wurde der Messbereich ausgewählt. Dazu wurde das Präparat zunächst unter geringer Beleuchtung durchgemustert und auf einen Bereich mit vielen Zellen der gewünschten Art eingestellt. Die eigentliche Markierung der Messbereiche erfolgte im nächsten Schritt unter UV-Licht. Der Computer zeigte eine Falschfarbendarstellung des selektierten Bereichs. Nun wurde für jede einzeln ausgewählte Zelle ein eigener Messbereich eingezeichnet, welcher vom Imaging-Analyseprogramm mit ROI (ROI = Region of interest) bezeichnet wurde (siehe Abbildung 2.6.). Das Programm war so eingestellt, dass während der Messung alle 5 Sekunden eine Belichtung mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm erfolgte. Die Emissionen bei Belichtung mit 340 nm und 380 nm wurden separat aufgezeichnet, des Weiteren wurde die Ratio aus beiden Werten sofort berechnet. Abhängig von der Fluoreszenzintensität der Zellen wurde die Belichtungsdauer vor Beginn jeder Messung - je nach Grad der Aufladung der Zellen - auf 20 ms bis 50 ms eingestellt.

Nach dem Versuchsstart wurde die Superfusion mit Tyrode weiter fortgesetzt, bis sich das Fluoreszenzsignal stabilisierte und über mindestens 5 Minuten eine gleichmäßig verlaufende Baseline aufgezeichnet werden konnte. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der zu testenden Substanz entweder per Superfusion oder durch Zugabe einer Stocklösung mittels Pipette in die Messkammer. Sobald eine Zugabe per Pipette erfolgte, wurde die Superfusion beendet, um ein vorzeitiges Auswaschen des Wirkstoffs zu vermeiden. Wurde vor der Zugabe der zu testenden Substanz ein Blocker zugegeben, so betrug die Inkubationszeit je nach verwendetem Blocker 10 bis 30 Minuten. Nachdem der zu testende Wirkstoff zugegeben wurde, wurde die Reaktion abgewartet und nach einer definierten Zeitspanne (abhängig vom Wirkstoff und der damit verbundenen Geschwindigkeit der ablaufenden Reaktion) ein Waschschrift der Messkammer mit Tyrode abgeschlossen. Jeder Versuch endete mit einer Vitalitätskontrolle, die entweder in der Zugabe von KCl (35 mmol/l) oder von Veratridin (25 µmol/l) bestand. Durch die Gabe von KCl wird die Zelle depolarisiert und es kommt zur Ausbildung von Aktionspotentialen

2. Material und Methoden

in Neuronen. Veratridin ist ein erregendes Neurotoxin, es öffnet spannungsabhängige Natriumkanäle (Ulbricht 1998). Die Zugaben beider Substanzen lassen bei vitalen Neuronen einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als Reaktion auf die Zugabe erwarten. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

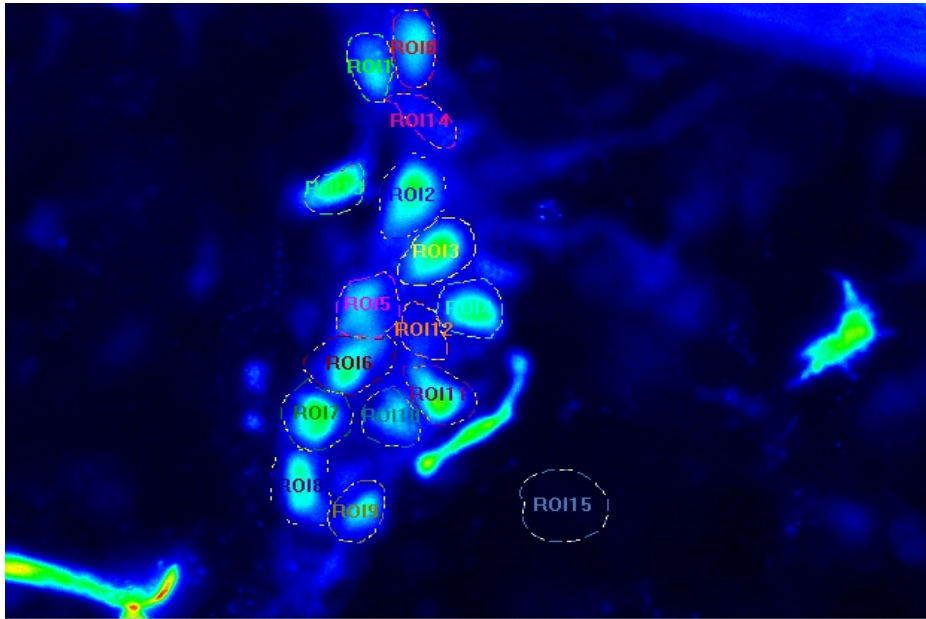


Abbildung 2.6. Falschfarbendarstellung eines mit Fura-2 aufgeladenen Ganglions aus dem Plexus submucosus

2.9.6. Datenerfassung und Datenauswertung

Die Datenerfassung sowie die Einstellung der Messparameter erfolgten mit der Imaging-Analysesoftware TILLvisION. Alle erfassten Daten wurden auf einer Computerfestplatte gespeichert. Die Auswertung der Reaktion der Zellen auf verschiedene getestete Wirkstoffe verlief nach einem definierten Schema: eine Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, welche als Antwort auf den vorangegangenen Stimulus gewertet wurde, lag vor, wenn zwei Bedingungen erfüllt waren: Erstens musste das ermittelte Maximum der Fura-2-Ratio nach Wirkstoffzugabe um einen Wert von mindestens 0,1 von der gemittelten Baseline abweichen, zweitens musste diese Abweichung größer

2. Material und Methoden

sein als die vierfache Standardabweichung der Baseline vor Zugabe der Testsubstanz. Erfüllte eine Zelle diese Kriterien, wurde sie als Responder gewertet. Es wurden außerdem nur Zellen ausgewertet, die eine Reaktion auf die Vitalitätskontrolle (35 mmol/l KCl bzw. 25 µmol/l Veratridin) zeigten.

2.10. Indirekte Immunfluoreszenz

2.10.1. Grundlagen der indirekten Immunfluoreszenz

Mithilfe der Methode der Immunfluoreszenz können antigene Strukturen an einem zu untersuchenden Präparat mit hochspezifischen Antikörpern, die gegen diese antigenen Strukturen gerichtet sind, sichtbar gemacht und damit nachgewiesen werden. Voraussetzung hierfür ist das Vorliegen eines entsprechenden Antikörpers, der an die antigene Struktur binden kann. So entsteht ein stabiler Antigen-Antikörper-Komplex mit multiplen, nicht-kovalenten Bindungen (Harlow und Lane 1988).

Bei der indirekten Immunfluoreszenz ist zur Darstellung der antigenen Zielstruktur nicht nur ein Antikörper, der an diese Zielstruktur bindet und als Primärantikörper bezeichnet wird, notwendig, sondern es muss noch ein zweiter, sogenannter Sekundärantikörper verwendet werden. Dieser Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet und an einen visuell detektierbaren Liganden gekoppelt. Die Sekundärantikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Nach Bindung des Primärantikörpers an die Zielstruktur im Präparat bindet im nächsten Schritt der farbstoffkonjugierte Sekundärantikörper an den Primärantikörper, und damit indirekt an die Zielstruktur. Die Durchführung mehrerer Waschschrte, sowohl nach Inkubation mit dem Primärantikörper als auch nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper, gewährleistet die Entfernung nicht gebundener Antikörper. Wird das markierte Präparat nun mit Licht der Anregungswellenlänge des konjugierten Farbstoffs betrachtet, so kann die Markierung der antigenen Struktur optisch über den Fluoreszenzfarbstoff dargestellt werden (Coons 1958).

2. Material und Methoden

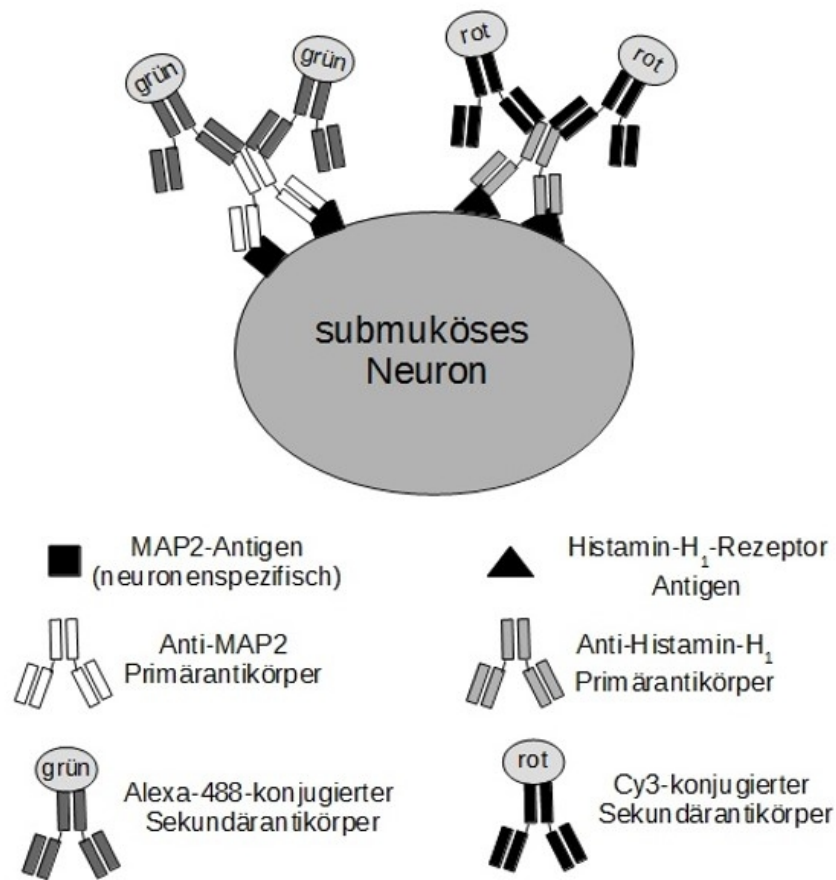


Abbildung 2.7. Prinzip der durchgeführten indirekten immunzytochemischen Markierungen am Beispiel des Histamin-H₁-Rezeptors.

Durch die Möglichkeit mehrerer Sekundärantikörper an nur einen Primärantikörper zu binden kommt es zur Signalverstärkung (Brelje et al. 2002). Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz ermöglicht die Anfertigung von Mehrfachmarkierungen. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich indirekte immunzytochemische Doppelmarkierungen angefertigt. Hierbei war zu beachten, dass die verschiedenen gleichzeitig verwendeten primären Antikörper nicht aus derselben Tierart stammten und die verwendeten sekundären Antikörper an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren.

2. Material und Methoden

2.10.2. Verwendete Antikörper

In meiner Arbeit wurden indirekte immunzytochemische Markierungen angefertigt, um die Expression der Histaminrezeptoren vom Typ H₁, H₂ und H₃ sowie des Enzyms Histidindecaboxylase (HDC), welches für die Histaminsynthese verantwortlich ist, in Neuronen des Plexus submucosus aus dem Kolon der Ratte zu überprüfen. Als Primärantikörper wurden zum einen polyklonale Antikörper verwendet, die gegen die Histaminrezeptoren H₁, H₂ oder H₃ bzw. gegen das Enzym HDC gerichtet waren. Zum anderen wurde als zweiter primärer Antikörper immer der monoklonale Neuronenmarker MAP2 (microtubule-associated protein 2) mitgeführt, um erkennen zu können, ob die mithilfe des polyklonalen Antikörpers dargestellte Struktur sich auf einem Neuron oder auf einem anderen Zelltyp befand. Eine Auflistung der verwendeten Primärantikörper findet sich in Tabelle 2.1.. Um die gebundenen Primärantikörper darstellen zu können, wurden Sekundärantikörper benötigt, welche an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren. Die verwendeten Sekundärantikörper sind in Tabelle 2.2. aufgeführt. Eine Übersicht über die angefertigten Doppelmarkierungen liefert Tabelle 2.3..

Primärantikörper	Zielstruktur	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-microtubule associating protein-2	Neuron	Maus	1:100	Sigma-Aldrich M9942
Anti-Histamin-H ₁ -Rezeptor	Histamin-H ₁ -Rezeptor	Kaninchen	1:100	Chemicon AB5652P
Anti-Histamin-H ₂ -Rezeptor	Histamin-H ₂ -Rezeptor	Kaninchen	1:100	Chemicon AB5656P
Anti-Histamin-H ₃ -Rezeptor	Histamin-H ₃ -Rezeptor	Kaninchen	1:100	Chemicon AB5660P
Anti-Histidin-decarboxylase	Histidin-decarboxylase	Ziege	1:100	Santa Cruz sc-34460

Tabelle 2.1. Verwendete Primärantikörper

2. Material und Methoden

Sekundärantikörper	Zielstruktur	Darstellung	Verdünnung	Hersteller
Cy3 donkey anti-rabbit IgG	Primär-antikörper aus dem Kaninchen	rot	1:250	Dianova 711-165-152
Cy3 donkey anti-goat IgG	Primär-antikörper aus der Ziege	rot	1:250	Chemicon AP180C
Alexa-488 donkey anti-mouse IgG	Primär-antikörper aus der Maus	grün	1:250	Invitrogen A121202

Tabelle 2.2. Verwendete Sekundärantikörper

Durchgeführte Doppelmarkierungen
Histamin-H ₁ -Rezeptor + Neuron
Histamin-H ₂ -Rezeptor + Neuron
Histamin-H ₃ -Rezeptor + Neuron
Histidindecaboxylase + Neuron

Tabelle 2.3. Durchgeführte Doppelmarkierungen

2.10.3. Negativkontrollen

Um die Möglichkeit, ein falsch positives Ergebnis zu erhalten, möglichst klein zu halten, wurden verschiedene Negativkontrollen durchgeführt. Um eine unspezifische Bindung des Cy3-konjugierten sekundären Antikörpers an das Zellpräparat ausschließen zu können, wurde stets eine Kontrolle mitgeführt, bei der kein Primärantikörper gegen den Histaminrezeptor H₁, H₂ oder H₃ bzw. gegen das Enzym HDC in der Primärantikörperlösung vorhanden war. Als zweite Negativkontrolle wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt, um eine unspezifische, wirtsspeziesstypische Bindung des Primärantikörpers ausschließen zu können. Hier wurde anstelle des Primärantikörpers gegen H₁, H₂, H₃ bzw. HDC die gleiche Konzentration eines Serums der Spezies, in welcher der Primärantikörper hergestellt worden war, in die Primärantikörperlösung gegeben (Kaninchenserum 1:100, Millipore, Schwalbach, Deutschland bzw. Ziegenserum 1:100, Dianova, Hamburg, Deutschland). Eine dritte Negativkontrolle wurde unter Zuhilfenahme eines Blockingpeptids (sc-34460 P, Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) für den Primärantikörper

2. Material und Methoden

gegen das Enzym HDC durchgeführt. Das Blockingpeptid entspricht hierbei dem Antigen, mit dessen Hilfe der Antikörper im Wirtstier produziert wurde. Der Primärantikörperlösung wurde das Blockingpeptid in einem Massenverhältnis von 10:1 zugesetzt. Durch die Zugabe des Blockingpeptids im Überschuss soll es, wenn der vorliegende primäre Antikörper wie vorgesehen spezifisch an seine Zielstruktur bindet, zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen kommen, wodurch sich nicht mehr ausreichend Primärantikörper in der Lösung befinden, um das Gewebe zu markieren. Eine Negativkontrolle mittels Blockingpeptid konnte für die Primärantikörper gegen H₁, H₂, H₃ nicht durchgeführt werden, da vom Hersteller keine entsprechenden Peptide für die verwendeten Primärantikörper angeboten wurden.

2.10.4. Fixierung der Zellkulturen

Die primären Zellkulturen der isolierten Submukosa aus dem Kolon der Ratte (siehe 2.6.1.) wurden, nachdem sie 2 - 3 Tage kultiviert wurden, zunächst fixiert, bevor die immunzytochemischen Doppelmarkierungen angefertigt werden konnten. Dazu wurde das Medium aus allen Wells der Vier-Well-Platte, welche die Glasplättchen mit den kultivierten Zellen enthielt, entnommen und durch 1 ml PBS-Lösung (siehe 2.3.3.2.) je Well ersetzt. Nach fünf Minuten wurde die PBS-Lösung wieder entnommen und jedes Well mit 1 ml Fixierungslösung (siehe 2.3.3.4.) beschichtet. Während der Inkubation mit der Fixierungslösung wurde die Vier-Well-Platte auf Eis gelagert. Nachdem die Fixierungslösung fünfzehn Minuten eingewirkt hatte, wurde sie wieder entfernt und durch PBS-Lösung ersetzt. Im Abstand von je fünf Minuten folgten zwei weitere Waschschriffe mit PBS-Lösung. Am Ende des Fixierungsschrittes wurde die PBS-Lösung bis zur weiteren Verarbeitung der Präparate in den Wells belassen. So fixiert konnten die Präparate einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden, bis sie für die immunzytochemischen Doppelmarkierungen verwendet wurden.

2. Material und Methoden

2.10.5. Herstellung der immunzytochemischen Doppelmarkierungen

Nach der Fixierung der Zellkulturpräparate erfolgte zunächst eine einstündige Inkubation mit Blockierungslösung bei Raumtemperatur. Dazu wurde zunächst die PBS-Lösung (siehe 2.3.3.2.) aus den Wells der Vier-Well-Platte entnommen; danach wurde in jedes Well der Vier-Well-Platte, welche die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen enthielt, 500 µl Blockierungslösung (siehe 2.3.3.5.) pipettiert. Die Blockierungslösung enthielt neben Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) auch Eselserum, also Serum der Tierart, in welcher die verwendeten Sekundärantikörper produziert wurden. Die Verwendung der Blockierungslösung sollte unspezifische Bindungsstellen am Zellkulturpräparat vor Zugabe der Antikörperlösungen blockieren. Die Blockierungslösung sowie die verschiedenen Antikörperlösungen enthielten Triton-X-100 als Detergens, um die Zellen zu permeabilisieren.

Danach wurde die Blockierungslösung aus den Wells entnommen und durch 500 µl Primärantikörperlösung (siehe 2.3.3.6.) je Well ersetzt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über 24 Stunden im Kühlschrank. Danach erfolgte ein Waschschriff, bei dem die Primärantikörperlösung zunächst aus den Wells entfernt und durch 1 ml Triton-X-100-haltige PBS-Lösung (siehe 2.3.3.3.) je Well ersetzt wurde. Diese wurde für fünf Minuten in den Wells belassen und nach Ablauf dieser Zeit wieder entfernt. Dieser Waschschriff mit Triton-X-100-haltiger PBS-Lösung wurde noch zweimal wiederholt, sodass insgesamt drei Waschschriffe von je fünf Minuten Dauer durchgeführt wurden. Nun erfolgte die Beladung der Wells mit je 0,5 ml Sekundärantikörperlösung (siehe 2.3.3.7.). Da die verwendeten Sekundärantikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt und somit lichtempfindlich waren, fanden dieser sowie alle folgenden Schritte unter Lichtschutz statt. Die Inkubation mit den Sekundärantikörperlösungen dauerte zwei Stunden und erfolgte bei Raumtemperatur. Es folgten, analog zum oben beschriebenen Prozedere, drei Waschschriffe mit PBS-Lösung, damit im Anschluss die Kernfärbung durch Beladung der Wells für 5 Minuten mit je 1 ml DAPI-Lösung (siehe 2.3.3.8.) durchgeführt werden konnte. Nach der Kernfärbung wurden abschließend noch einmal drei Waschschriffe mit PBS-Lösung durchgeführt.

2. Material und Methoden

Die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen wurden aus den Wells der Vier-Well-Platte entnommen und mit den Zellen nach unten auf einen mit einem Tropfen Hydromount® (National diagnostics, Atlanta, Georgia, USA) beschichteten Objektträger geklebt. Auf diese Weise stellte das kultivierte Glasplättchen sein eigenes Deckgläschen dar. Die entstandenen gefärbten Präparate wurden möglichst zeitnah mikroskopisch ausgewertet und unter Lichtschutz im Kühlschrank gelagert.

Das genaue Arbeitsprotokoll zur Erstellung der immunzytochemischen Doppelmarkierungen ist in Tabelle 2.4. aufgeführt.

Arbeitsschritt	Reagenz	Temperatur	Zeit
Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	Blockierungslösung	Raumtemperatur	1 Stunde
Inkubation mit Primärantikörpern	Primärantikörperlösung mit Primärantikörpern A+B	4°C	24 Stunden
Waschschritt	Triton-X-100-haltige PBS-Lösung	Raumtemperatur	3 x 5 Minuten
Inkubation mit Sekundärantikörpern (Lichtschutz)	Sekundärantikörperlösung mit Sekundärantikörpern A+B	Raumtemperatur	2 Stunden
Waschschritt (Lichtschutz)	PBS-Lösung	Raumtemperatur	3 x 5 Minuten
Kernfärbung (Lichtschutz)	Lösung zur Kernfärbung	Raumtemperatur	5 Minuten
Waschschritt (Lichtschutz)	PBS-Lösung	Raumtemperatur	3 x 5 Minuten
Einbetten (Lichtschutz)	1 Tropfen Hydromount®	Raumtemperatur	

Tabelle 2.4. Protokoll zur Herstellung der immunzytochemischen Doppelmarkierungen

2. Material und Methoden

2.10.6. Mikroskopie

Die Betrachtung der immunzytochemischen Doppelmarkierungen erfolgte lichtmikroskopisch (Eclipse 80i; Nikon, Düsseldorf, Deutschland). Zur Darstellung der verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen wurde mittels spezieller Filterköpfe Licht unterschiedlicher Wellenlängen erzeugt. Cy3-konjugierte Sekundärantikörper wurden durch Licht mit der Wellenlänge 510 – 530 nm angeregt. Sie emittieren Licht mit einer Wellenlänge von 630 – 660 nm. Zur Anregung der AlexaFluor488-konjugierten Sekundärantikörper wurde Licht der Wellenlänge 450 – 490 nm verwendet. Die Emissionswellenlänge beträgt hier 510 – 530 nm. Die Kernfärbung mittels des Farbstoffs DAPI konnte durch Anregung bei 358 nm dargestellt werden. Hier beträgt die Emissionswellenlänge 461 nm. Zur Bilddokumentation wurde eine Schwarz-Weiß-Kamera verwendet (s/w Camera Digital Slight DS 2 M Bwc; Nikon). Um eine farbige Darstellung zu erhalten, wurde mithilfe des Programms NIS-Elements 2.30 (Nikon) den unterschiedlichen Emissionswellenlängen je eine Farbe zugeordnet. So wurde emittiertes Licht eines Cy3-konjugierten Antikörpers immer rot dargestellt, das Licht eines AlexaFluor488-konjugierten Antikörpers erschien grün und die Kernfärbung mit DAPI stellte sich blau dar. Die Betrachtung der Präparate erfolgte jeweils für einen Ausschnitt in den drei oben aufgeführten Wellenlängenbereichen, wobei jede Einzelbetrachtung eines Farbkanals auch als Einzelbild fotografiert und abgespeichert wurde. Außerdem wurde für jeden Ausschnitt auch ein Overlay erstellt, bei dem alle drei zuvor einzeln betrachteten Farbdarstellungen übereinander gelegt wurden.

2.11. Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.11.1. Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) stellt ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten dar, das 1983 von Kary B. Mullis entwickelt wurde. Um diese Amplifikation bestimmter Nukleinsäuren zu ermöglichen, müssen kurze Abschnitte doppelsträngiger DNA, sogenannte Oligonukleotide mit einer Größe von etwa 20 Basenpaaren, vorliegen, die ein freies 3'-OH-Ende aufweisen und während der Reaktion verlängert werden können. Diese Oligonukleotide, auch als Primer bezeichnet, können synthetisiert und für die gewünschten Nukleinsäureabschnitte gekauft werden. Dabei ist zu beachten, dass die Primer komplementär zu den DNA-Sequenzen sein müs-

2. Material und Methoden

sen, die den gewünschten Nukleinsäureabschnitt flankieren. Die PCR besteht aus drei aufeinander folgenden Schritten, die in Abbildung 2.8. dargestellt sind und als Denaturierung, Annealing und Elongation bezeichnet werden. Zunächst findet die Denaturierung der DNA statt. Hierbei wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen der Probe auf 92 – 95 °C aufgetrennt. So entstehen Einzelstränge, die im weiteren Prozess als Matrize für die Vervielfältigung der Nukleinsäuresequenzen dienen. Im zweiten Schritt wird die Temperatur wieder abgesenkt. Die Temperatur, die erreicht werden muss, richtet sich hier nach der spezifischen Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Nun kommt es zum sogenannten Annealing, das eine Hybridisierung der Primer an die komplementäre Matrizen-DNA darstellt. Dann wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, damit die Elongation beginnen kann. Dieser Schritt stellt die Verlängerung der Primer, komplementär zur Matrizen-DNA, durch eine hitzestabile DNA-Polymerase dar.

In meiner Arbeit wurde die Taq-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* stammt, eingesetzt, da diese eine hohe Enzymaktivität aufweist und bis 95 °C temperaturstabil ist. Somit war das Enzym dazu in der Lage den Denaturierungsschritt zu überstehen. Damit die Verlängerung der DNA-Sequenzen stattfinden kann, müssen freie Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) sowie Magnesiumionen vorhanden sein. Am Ende dieses Schrittes liegen alle DNA-Moleküle wieder doppelsträngig vor. Diese drei Schritte werden nun zyklisch 30 bis 40 mal wiederholt. Die Amplifikate, die bei einem Zyklus gewonnen werden, können im nächsten Zyklus als Matrize dienen, so dass die Anzahl der DNA-Sequenzen exponentiell ansteigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR verwendet, um die Expression der Histaminrezeptoren vom Typ H₁, H₂, H₃ und H₄ sowie des Enzyms Histidindecaboxylase, welches für die Histaminsynthese verantwortlich ist, in einem Homogenisat isolierter Submukosa der Ratte zu überprüfen. Hierzu musste zunächst eine Reverse Transkription (RT) durchgeführt werden, bei der das Enzym Reverse Transkriptase zunächst RNA in komplementäre DNA (cDNA) transkribierte. Im nächsten Schritt wurde die gewonnene cDNA mittels PCR vervielfältigt.

2. Material und Methoden

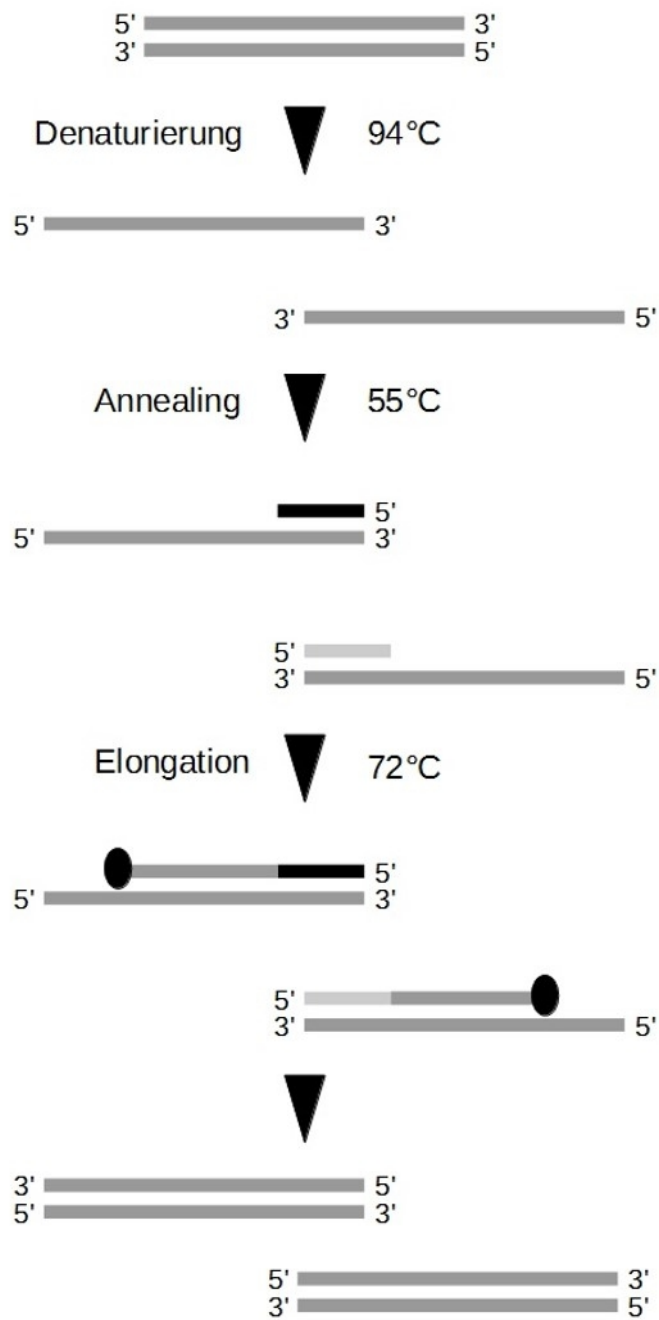


Abbildung 2.8. Prinzip der PCR, Darstellung eines Zyklus.

2. Material und Methoden

2.11.2. Isolation der mRNA

Isolierte Submukosa wurde nach der Präparation bis zur weiteren Verwendung sofort in RNAlater™ RNA Stabilization Agent (Qiagen, Hilden, Deutschland) überführt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Aufbewahrung in RNAlater™ RNA Stabilization Agent sollte die Stabilisierung der im Gewebe vorhandenen RNA gewährleisten und die Aktivität von RNasen hemmen (RNAlater® Handbook, <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center>). Zur weiteren Verarbeitung wurden 30 mg der isolierten Submukosa in ein Tube (Fassungsvermögen 2 ml) verbracht und zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zu dem gefrorenen Gewebe wurde nun eine Metallkugel (Durchmesser 5 mm) gegeben und das Tube in die Schwingmühle (MM301; Retsch, Haan, Deutschland) verbracht. Mithilfe der Metallkugel wurde die gefrorene isolierte Submukosa nun in der Schwingmühle für 2 Minuten bei 30 Hertz zerkleinert, bis ein Homogenisat vorlag. Die Isolation der RNA erfolgte unter Verwendung des peq GOLD Total RNA Kits (PepLab, Erlangen, Deutschland).

Die Ausbeute der RNA-Isolation wurde photometrisch (BioPhotometer plus; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in µg/ml bestimmt. Eine Kontrolle, ob auch messenger RNA (mRNA) isoliert werden konnte, erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung der isolierten RNA. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

Um ausschließen zu können, dass die isolierte RNA bereits genomische DNA enthielt, wurde als Negativkontrolle im Anschluss an jede Isolation eine PCR nach dem in Tabelle 2.9. beschriebenen Programm durchgeführt, bei der RNA anstelle von cDNA eingesetzt wurde (zur sonstigen Zusammensetzung des Reaktionsansatzes siehe Tabelle 2.8.).

2.11.3. Reverse Transkription (RT) zur Synthese der cDNA

Um aus der isolierten RNA schließlich cDNA, die komplementäre DNA darstellt, zu erhalten, wurde eine reverse Transkription (RT) durchgeführt. Hierfür wurde das Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) verwendet. Tabelle 2.5. führt den verwendeten Versuchsansatz, bestehend aus der Zusammensetzung des verwendeten Primermixes und dem eingesetzten Probenvolumen, auf. Um eine Verunreinigung der eingesetzten Substanzen des Tetro cDNA Synthesis Kits mit genomischer DNA aus-

2. Material und Methoden

schließen zu können, wurden bei jeder durchgeführten reversen Transkription zwei Versuchsansätze mitgeführt, bei denen die eingesetzte RNA durch RNase-freies Wasser ersetzt wurde. Diese Ansätze wurden nach Beendigung der RT, ebenso wie die Proben, bei -80°C gelagert. Sie wurden bei der Amplifizierung der cDNA als Negativkontrollen verwendet (siehe 2.11.4.).

Komponenten Primermix RT	Volumen
Gesamt-RNA	6 µl
Random Hexamer Primer	1 µl
dNTPs (10 mmol/l)	1 µl
5 x RT-Buffer	4 µl
Ribosafe RNase Inhibitor	1 µl
Tetro Reverse Transkriptase (200 U/ml)	1 µl
RNase-freies Wasser	6 µl
Summe	20 µl

Tabelle 2.5. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die RT

Der RT-Ansatz wurde mit der Pipette gründlich durchmischt und nachfolgend im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) mit dem in Tabelle 2.6. beschriebenen Programm inkubiert.

Schritt	Zeit	Temperatur
1	10 Minuten	25°C
2	60 Minuten	45°C
3	5 Minuten	85°C

Tabelle 2.6. Programm des Cyclers für die reverse Transkription

2. Material und Methoden

Nach Beendigung des Programms wurden die Proben sofort auf Eis gelagert und durch Zugabe von 80 µl RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Photometrisch (BioPhotometer plus; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) konnte die Menge an synthetisierter cDNA bestimmt werden. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.11.4. PCR zur Amplifizierung der cDNA

Nach erfolgter Herstellung der cDNA mittels RT wurde diese auf das Vorhandensein der spezifischen DNA-Abschnitte für die Histaminrezeptoren vom Typ H₁, H₂, H₃ und H₄ sowie auf das Vorhandensein des DNA-Abschnitts, welcher für das Enzym Histidin-decarboxylase (HDC) kodiert, mittels PCR untersucht.

Zielmolekül	Primersequenz	Produktgröße	Genbank accession number
Histamin-H ₁ -Rezeptor	<i>forward:</i> CCTCTACCTTCGAAGACAAG <i>backward:</i> GTCTTGGTTCGGTACCTCAG	405 bp	NM_017018
Histamin-H ₂ -Rezeptor	<i>forward:</i> ATGGCATTGAAAGTCACC <i>backward:</i> GACCAAAGAGATGGCAAC	377 bp	NM_012965
Histamin-H ₃ -Rezeptor	<i>forward:</i> CAGCGTTACCTTCTTCAACC <i>backward:</i> CAGCTCGGATGATCATTAGG	511 bp	NM_053506
Histamin-H ₄ -Rezeptor	<i>forward:</i> TAACGATAGGCAATGCTGTG <i>backward:</i> TCTTCCAAGAATCCGAAGCC	390 bp	NM_131909
Histidin-decarboxylase	<i>forward:</i> CATGAATACCAAGCTAGAGG <i>backward:</i> CAAGCAGTTCATGGCATCAG	294 bp	M29591
GAPDH	<i>forward:</i> ACGGGAAGCTCACTGGCATG <i>backward:</i> CCACCACCCTGTTGCTGTAG	303 bp	BC059110

Tabelle 2.7. Auflistung der verwendeten Primer und Datenbankeintrag in der Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2. Material und Methoden

Die verwendeten Primer wurden einer Publikation (Lazarov et al. 2006) entnommen. Um den Erfolg der RNA-Isolation, der cDNA Synthese sowie der Amplifizierung der cDNA zu überprüfen wurden als interne Kontrolle Primer für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt. GAPDH gehört zu den sogenannten house-keeping genes. Hierbei handelt es sich um Gene, die in allen Zellen konstitutiv exprimiert werden. Alle Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen und sind in Tabelle 2.7. aufgeführt.

Der Reaktionsansatz für die PCR wurde nach dem in Tabelle 2.8. dargestellten Rezept für jede Probe in einem separaten Tube (Fassungsvermögen 200 µl) angesetzt. Es wurde mit einem kommerziell erhältlichen MasterMix gearbeitet (MangoMix™; Bioline, Luckenwalde, Deutschland). Um eine Verunreinigung der eingesetzten Primer bzw. des eingesetzten RNase-freien Wassers mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurden als Negativkontrollen stets Ansätze mitgeführt, bei denen die eingesetzte cDNA durch RNase-freies Wasser ersetzt wurde. Als zweite Negativkontrolle wurden Reaktionsansätze mitgeführt, bei denen die cDNA durch das Produkt der Negativkontrollen aus der RT (siehe 2.11.3.) ersetzt wurde.

Komponenten Primermix PCR	Volumen
cDNA	1 µl
Primer forward	1 µl
Primer backward	1 µl
MangoMix™	12,5 µl
RNase-freies Wasser	9,5 µl
Summe	25 µl

Tabelle 2.8. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR

Um eine gleichmäßige Verteilung der verschiedenen Komponenten des Reaktionsansatzes zu gewährleisten, wurde jeder Reaktionsansatz kurz mittels Vortexer durchmischt und im Anschluss für einige Sekunden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, damit sich die gesamte Probe am Boden des Tubes befand. Die Ansätze wurden im Thermocycler

2. Material und Methoden

(Mastercycler Gradient, Eppendorf) mit dem in Tabelle 2.9. beschriebenen Programm inkubiert.

Schritt	Reaktion	Zeit	Temperatur
1	Denaturierung	10 Minuten	94°C
2	Denaturierung	1 Minute	94°C
3	Annealing	0,5 Minuten	55°C
4	Elongation	1 Minute	72°C
5	40 Zyklen der Schritte 2-4		
6	Elongation	10 Minuten	72°C

Tabelle 2.9. Programm des Cyclers für die PCR

2.11.5. Gelelektrophorese

Um die amplifizierten PCR-Produkte schließlich optisch darstellen zu können, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein 2,5 % (Gew/Vol) Agarosegel, bestehend aus Standardagarose (Pqrlab, Erlangen, Deutschland) gelöst in TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) hergestellt. Beide Substanzen wurden gemeinsam mehrmals in der Mikrowelle erhitzt, um eine Lösung der Agarose zu erreichen. Zur späteren Darstellung der Banden unter UV-Licht wurde dem Gel bereits im Herstellungsprozess der Farbstoff Roti®-GelStain (Roth, Karlsruhe, Deutschland) beigemischt. Nach Aushärtung des Gels in der Elektrophoresekammer wurde es mit TAE-Puffer überschichtet, welcher den Laufpuffer darstellte. Nun wurden jeweils 6 µl (bei Beladung eines Gels mit 40 Taschen) bzw. 10 µl (bei Beladung eines Gels mit 20 Taschen) der Proben in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Um die Größe der Amplifikate ablesen zu können, wurden außerdem, in Abhängigkeit von der Anzahl der Geltaschen, 5 µl bzw. 8 µl einer DNA-Leiter aufgetragen (GeneRuler 50 bp DNA ladderM; Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland).

2. Material und Methoden

Im nächsten Schritt wurde der Elektrophoresekammer für 2 Stunden eine Spannung von 50 V (Stromfluss ca. 750 mA) angelegt, um die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zu erreichen. Danach wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und unter UV-Licht verbracht. So konnten die aufgetrennten Produkte in Form von Banden dargestellt und fotografisch dokumentiert werden.

2.12. Mikroelektroden-Ableitung des Membranpotentials

2.12.1. Die Ermittlung des Membranpotentials mittels Mikroelektrode

Durch die unterschiedliche Ionenverteilung intrazellulär und extrazellulär in Kombination mit der unterschiedlich schnellen Diffusionsgeschwindigkeit verschiedener Ionen durch die Membran entsteht an der Zellmembran eine elektrische Spannung, das sogenannte Membranpotential. Intrazelluläre Ableitungen des Membranpotentials von einzelnen Zellen sowie dessen Veränderung als Reaktion auf verschiedene Wirkstoffe können mithilfe von Mikroelektroden erfolgen. Die Ableitung des Membranpotentials submuköser Neurone im intakten Submukosapräparat konnte, dank der freundlichen Unterstützung von Herrn Dr. Althaus (Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen), an einem Messstand im Institut für Tierphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen erfolgen. Eine Mikroelektrode (intrazellulär) sowie eine Referenzelektrode (extrazellulär) aus chloriertem Silberdraht waren an einen Verstärker angeschlossen, der die Spannungsdifferenz (= Membranpotential) zwischen den Elektroden maß.

2.12.2. Versuchsdurchführung

Glaskapillaren zur intrazellulären Ableitung wurden mithilfe eines Pullers der Firma Zeitz (DMZ-Puller, Programm 12; Zeitz Instruments, Martinsried, Deutschland) aus Borosilikatglas zu Beginn jedes Versuchstages neu hergestellt. Diese Glaskapillaren wurden vor Benutzung mit einer Kaliumchloridlösung (1 mol/l) gefüllt und in die Messapparatur eingebaut. Die isolierte Submukosa (siehe 2.5.3.) wurde direkt auf Zellkulturschalen (Durchmesser 35 mm) aufgeklebt und mit 3 ml Tyrode (siehe 2.3.1.2.) überschichtet. Um die Erkennung der Ganglien im Submukosapräparat zu erleichtern, wur-

2. Material und Methoden

den die Präparate mit einer Färbelösung (siehe 2.3.1.5.) für mindestens 1 Stunde mit Fura-2 aufgeladen. Die Zellkulturschale stellte gleichzeitig die Messkammer dar und wurde am Beginn jeder Messung in eine spezielle Aussparung auf dem Objektträgertisch eingesetzt. Zur Betrachtung des Gewebepreparates diente ein inverses Mikroskop, es wurde ein 32-fach vergrößerndes Objektiv verwendet. Die Darstellung des Farbstoffs Fura-2 erfolgte mittels UV-Lampe sowie geeignetem Filter (Anregungswellenlänge 360 nm) und diente zur groben Orientierung im Submukosapreparat. Die genaue Auswahl und Darstellung der Neurone, die untersucht werden sollten, erfolgte bei Beleuchtung mit sichtbarem Licht.

Zur Steuerung der Position der Mikroelektrode wurde ein Mikromanipulator der Firma Luigs Neumann (LN SM1, Luigs Neumann, Ratingen, Deutschland) verwendet. Die Glaskapillare wurde mithilfe des Mikromanipulators zunächst in die Tyrode eingetaucht und das dabei gemessene Offset-Potential kompensiert. Danach wurde die Glaspipette in die Zellschicht des Gewebes eingestochen und unter ständiger Sichtkontrolle vorsichtig an das zu untersuchende Neuron herangeführt. Das Ziel war es, mit der Mikroelektrode in das Innere der Zelle einzudringen. War die Penetration der Zellmembran erfolgt, zeigte sich dies an einer sprunghaften Änderung des gemessenen Potentials, welches je nach Neuron bei etwa -20 bis -35 mV lag.

Die Messung des Potentials erfolgte über die Mikroelektrode sowie zwei Referenzelektroden, die mit einem Verstärker der Firma NPI (Turbo Tec-01/02C; NPI, Tamm, Deutschland) verbunden waren. Die Referenzelektroden wurden randständig und mit möglichst großem Abstand zueinander im Messpuffer platziert. Die zweite Referenzelektrode war zur Ableitung des Membranpotentials nicht notwendig, die Erfahrung im Institut für Tierphysiologie zeigte jedoch, dass der Versuchsaufbau weniger störanfällig war, wenn eine zweite Referenzelektrode angeschlossen war.

Es handelte sich bei dem verwendeten Verstärker zwar um einen Voltage-Clamp-Verstärker, da eine zweite Elektrode zur Applizierung einer bestimmten Strommenge jedoch nicht angeschlossen war, erfolgte die Messung im Open-Circuit-Modus. Nach Aufzeichnung des basalen Membranpotentials des Neurons für mindestens drei Minuten erfolgte die Gabe von Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) per Pipette in die Messkammer. Die Änderung des Membranpotentials wurde gemessen. Nach spätestens 15 Minuten erfolgte eine

2. Material und Methoden

Stabilisierung des Potentials. Da kein Perfusionssystem an den Messstand angeschlossen war, konnte Histamin jedoch nicht ausgewaschen werden. Anschließend wurde als interne Kontrolle, ob es sich bei der abgeleiteten Zelle wirklich um ein Neuron handelte, Veratridin ($25 \mu\text{mol/l}$) in die Messkammer pipettiert. Die Messungen des Membranpotentials wurden mithilfe eines Schreibers mit einer Schreibgeschwindigkeit von 1 cm pro Minute aufgezeichnet.

2.13. Ussingkammer-Messungen

2.13.1. Theorie der Ussingkammer-Messungen

Die Ussingkammer-Technik stellt eine Möglichkeit dar, elektrogene Transportprozesse an isolierten Geweben *in vitro* aufzuzeichnen. Diese Technik wurde Anfang der fünfziger Jahre von Hans H. Ussing an Froschhaut entwickelt (Ussing und Zerahn 1951). Um die Bewegung von elektrisch geladenen Teilchen durch epitheliale Membranen und die damit einhergehende transepitheliale Potentialänderung beschreiben zu können, entwickelten Ussing und Zerahn ein Ersatzschaltkreismodell, in welchem das Gewebe als elektrischer Widerstand betrachtet wird, wobei die einzelnen Widerstände für die mukosale Seite des Gewebes und die serosale Seite des Gewebes in Reihe geschaltet werden (siehe Abbildung 2.9.).

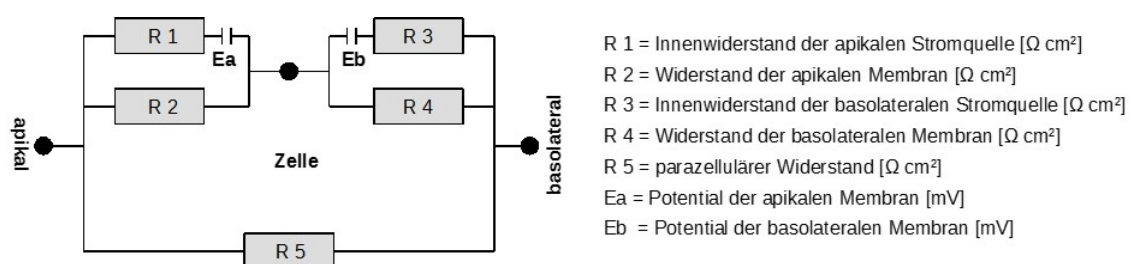


Abbildung 2.9. Ersatzschaltkreismodell nach Ussing. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

2. Material und Methoden

An die Ussingkammern wurden zwei Elektrodenpaare angebracht, die über Agarbrücken (5 % Agar (Gew/Vol) gelöst in Parsons-Lösung) mit der Kammer verbunden waren. Das erste Elektrodenpaar wurde gewebe nah, in einem Abstand von etwa 1 mm zum Gewebe, angebracht. Es diente dazu, die Potentialdifferenz zwischen der mukosalen und der serosalen Gewebeseite zu bestimmen. Aufgrund der gewebe nahen Platzierung der Elektroden wurden Messartefakte durch den Einfluss des Lösungswiderstandes des Messpuffers auf die Potentialdifferenz minimiert. Ein zweites Elektrodenpaar wurde gewebe fern an den Außenseiten der Ussingkammern angebracht. Dieses zweite Elektrodenpaar bestand aus Ag/AgCl und diente der Stromapplikation. Durch eine gewebe ferne Platzierung sollte eine gleichmäßige Stromdichte am Gewebe erzielt werden.

Die Ussingkammern konnten in zwei verschiedenen Messmodi betrieben werden, zum einen dem Open-Circuit-Modus, zum anderen dem Voltage-Clamp-Modus (siehe Abbildung 2.10.). Zu Beginn jedes Versuchs wurde zunächst der Open-Circuit-Modus gewählt, bei dem kein Strom appliziert wurde, sondern lediglich die transepitheliale Potentialdifferenz über ein Voltmeter bestimmt wurde. Durch die Bedingungen im Open-Circuit-Modus konnte sich zunächst wieder ein Gleichgewicht des Ionentransports beim frisch eingespannten Gewebe einstellen. Beide Kammerhälften waren mit 3,5 ml desselben Messpuffers befüllt, sodass sowohl der hydrostatische Druck als auch chemische Gradienten als Antriebskräfte für den Stofftransport keine Rolle spielten. Am Kolon und Jejunum der Ratte werden spontan Anionen an der mukosalen Membran sezerniert, in erster Linie Cl^- und HCO_3^- (Kolon: Strabel und Diener 1995, Jejunum: Cox und Cuthbert 1988). Dadurch wird die mukosale Seite gegenüber der serosalen Seite des Darms um einige Millivolt negativer geladen, es entsteht eine transepitheliale Potentialdifferenz. Im Anschluss an den Open-Circuit-Modus wurde in jedem Versuch auf den Voltage-Clamp-Modus umgeschaltet. Im Voltage-Clamp-Modus wurde über eine Stromquelle der sogenannte Kurzschlussstrom (I_{sc}) appliziert. Die applizierte Strommenge richtete sich dabei nach der gemessenen Potentialdifferenz, sie wurde so gewählt, dass sie die Potentialdifferenz auf 0 mV klemmte. Die applizierte Strommenge entsprach also der epithelialen Netto-Ionenbewegung, war dieser jedoch entgegengesetzt. Der Kurzschlussstrom ist so definiert, dass er bei Anionensekretion, also dem Transport negativ geladener Teilchen von serosal nach mukosal, positiv ausfällt.

2. Material und Methoden

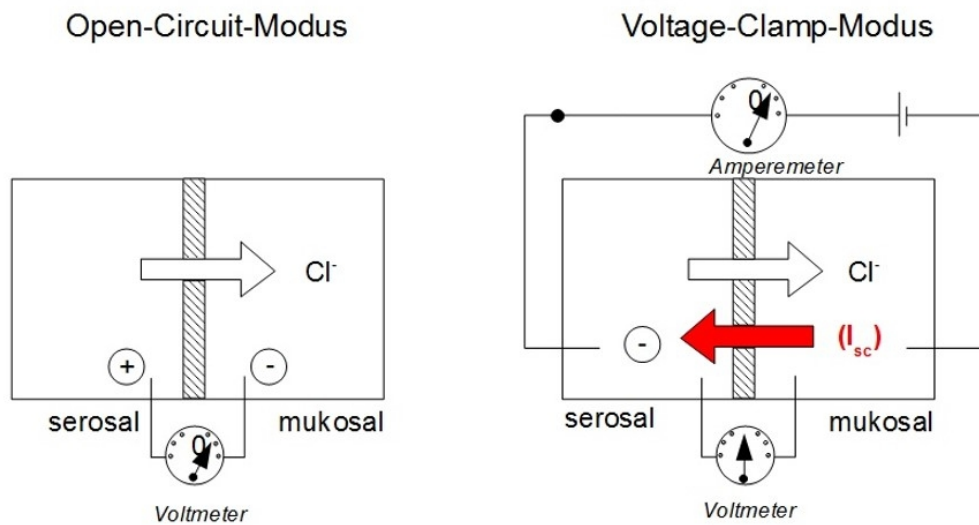


Abbildung 2.10. Prinzip der Messmodi Open-Circuit und Voltage-Clamp. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

2.13.2. Messkammer

Die Ussingkammern, die in dieser Arbeit verwendet wurden, unterscheiden sich von den von Ussing entwickelten Kammern, weshalb man auch von modifizierten Ussingkammern spricht. Abbildung 2.11. zeigt den schematischen Aufbau einer solchen modifizierten Ussingkammer. Jede verwendete Ussingkammer bestand aus zwei Plexiglasskammerhälften, die über Plexiglasschrauben fest miteinander verbunden wurden. Die Kammerhälften waren über eine 1 cm² große Aussparung miteinander verbunden. Beim Versuchsaufbau wurde das Gewebe so in die Ussingkammern eingespannt, dass beide Halbzellen durch das Gewebe voneinander getrennt wurden. Um einen wasserdichten Verschluss der Ussingkammern zu gewährleisten, wurde die Kontaktfläche beider Halbzellen mit einem Silikonfilm bedeckt. Jede Halbzelle hatte ein Volumen von 3,5 ml. Das Befüllen mit Pufferlösung, Waschschrte sowie die Applikation von verschiedenen Wirkstoffen konnten an jeder Halbzelle über eine Öffnung an der Oberseite stattfinden. Die Pufferlösung in den Halbzellen umspülte während des Versuchs das Gewebe von beiden Seiten und wurde durch ein Wasserbad konstant auf einer Temperatur von 37 °C gehalten. Eine kontinuierliche Begasung des Messpuffers mit Carbogen (95 % O₂, 5 %

2. Material und Methoden

CO₂) erfolgte über zwei Gasfritten am Boden der Ussingkammerhälften. Durch die ständige Begasung wurde der pH-Wert des Messpuffers konstant gehalten sowie die Sauerstoffversorgung des Gewebes gewährleistet. Die epithelialen Funktionen des Kolongewebes können unter diesen Bedingungen bis zu 6 Stunden nach der Organentnahme erhalten bleiben, ohne dass morphologische Veränderungen beobachtet werden können (Diener et al. 1989).

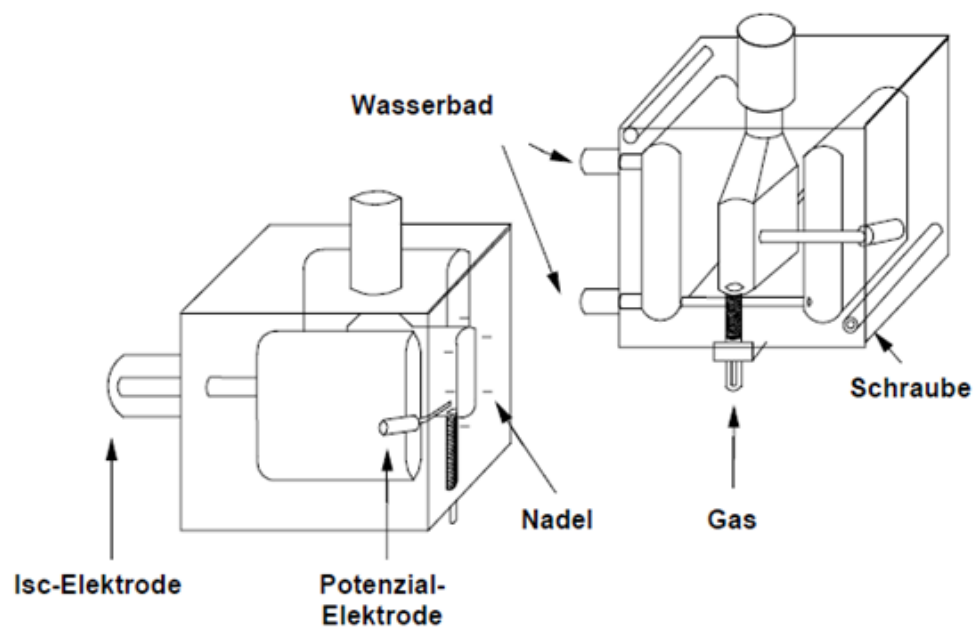


Abbildung 2.11. Darstellung einer modifizierten Ussingkammer (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

2.13.3. Versuchsdurchführung und Datenerfassung

Das in dieser Arbeit verwendete Gewebe, Submukosa-Mukosa-Präparate des Rattenkolons bzw. intakte Jejunumsegmente der Ratte, wurde in die Ussingkammer eingespannt. Dazu wurde es über die mittig gelegene Öffnung gespannt und durch Aufspießen auf Metallstifte befestigt. Danach konnte die Ussingkammer geschlossen und mit den Plexiglasschrauben verschraubt werden. Nun lagen beide Kammerhälften durch das eingespannte Gewebe voneinander getrennt vor. Nach Befüllung der Kammern mit Parsons-Lösung (siehe 2.3.1.1.) wurde zunächst eine Stabilisierung des Kurzschlussstroms abgewartet, die daran zu erkennen war, dass dieser sich auf ein stabiles Plateau einstellte.

2. Material und Methoden

Diese Äquilibrationsphase dauerte mindestens 60 Minuten. Danach konnten die zu testenden Substanzen zugeben werden.

Die elektrischen Parameter, wie transepitheliale Potentialdifferenz (Pd), Kurzschlussstrom (I_{sc} = short-circuit current) oder Gewebeleitfähigkeit (G_t = Kehrwert des Widerstandes), wurden computergesteuert von einer Voltage-Clamp-Anlage (Aachen Microclamp; AC Copy Datentechnik, Aachen, Deutschland) sowie einer speziellen Software (Winclamp; Dipl. Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Deutschland) kontinuierlich erfasst und gespeichert. Zur Bestimmung der Gewebeleitfähigkeit wurde jede Minute ein bipolarer Stromimpuls von $\pm 50 \mu A$ mit einer Dauer von 200 ms an das Gewebe angelegt. Daraus resultierte eine Änderung in der gemessenen Potentialdifferenz, mit deren Hilfe die Gewebeleitfähigkeit nach dem Ohm'schen Gesetz ($R = U/I$) berechnet werden konnte. Der Kurzschlussstrom wurde als Ladungsverschiebung eines monovalenten Ions pro Zeit und Gewebefläche in $\mu Eq/(h \cdot cm^2)$ angegeben ($1 \mu Eq/(h \cdot cm^2) = 26,9 \mu A/cm^2$). Um Messfehler durch die entstehende Potentialdifferenz zwischen den einzelnen Elektroden sowie den elektrischen Widerstand der verwendeten Lösungen zu vermeiden, wurden diese Größen vor jeder Messung bestimmt und von den Messdaten abgezogen. Nach erfolgter Messung wurden die Daten in ein Tabellenkalkulationsprogramm übertragen und die Werte des Kurzschlussstroms (I_{sc}) ausgewertet. Bestimmt wurde zunächst eine Baseline, die den Mittelwert der Werte aus den letzten drei Minuten vor Wirkstoffzugabe darstellte. Der höchste Wert nach Wirkstoffzugabe wurde als Peak gewertet, die Differenz aus Baseline und Peakhöhe ergab die eigentliche Peakhöhe Δ_{peak} .

2.14. Messungen der parazellulären Permeabilität

Während der Ussingkammer-Versuche wurde die parazelluläre Permeabilität der Kolonpräparate bzw. Jejunumsegmente bestimmt. Hierzu wurde Fluorescein ($100 \mu mol/l$) (Sigma-Aldrich) als Farbstoff in die mukosale Seite der Messkammer pipettiert und alle 30 Minuten eine Probe mit einem Volumen von $100 \mu l$ aus der serosalen Seite der Messkammer entnommen und durch $100 \mu l$ Parsons (ggf. mit Substitution von Blockern) ersetzt. Die erste Probe wurde dabei 30 Minuten nach der Zugabe von Fluorescein entnommen, dieser Zeitpunkt wurde als t_0 bezeichnet. Die weiteren Zeitpunkte der Entnah-

2. Material und Methoden

me wurden demzufolge als t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{120} und t_{150} bezeichnet. Im Anschluss an den Versuch wurden die Proben bei einer Geschwindigkeit von 11.000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert, um eine Streulichtbildung durch Schwebstoffe in der Probe zu vermeiden. Die Extinktion der Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm ermittelt. Zur Ermittlung der Farbstoffkonzentration in den untersuchten Proben wurde das Lambert-Beer'sche Gesetz angewendet:

Lambert-Beer'sches Gesetz: $E = \epsilon \cdot c \cdot d$

Hierbei bezeichnet E die gemessene Extinktion, ϵ ist der Extinktionskoeffizient (in $l/(mol \cdot cm)$), c gibt die Konzentration der untersuchten Probe in mol/l an und d bezeichnet die Schichtdicke der Küvette in cm. Um diese Formel anwenden zu können, wurde der Extinktionskoeffizient ϵ initial experimentell mittels Anfertigung und Messung einer Konzentrationsreihe bestimmt; er betrug $85.000 l/(mol \cdot cm)$.

Die Verdünnung der Farbstoffkonzentration auf der serosalen Seite der Messkammer, die sich durch Ersetzen des Probevolumens mit Pufferlösung ergab, wurde bei der Berechnung der Farbstoffkonzentration rechnerisch korrigiert.

Um die Transportrate durch das Epithel zu bestimmen, wurden je zwei Farbstoffkonzentrationen aus Proben von aufeinander folgenden Zeitpunkten verwendet. So ergab der Vergleich der Farbstoffkonzentrationen der Probenentnahme zum Zeitpunkt t_0 mit dem Zeitpunkt t_{30} , die Stoffmenge des transportierten Farbstoffs pro Zeiteinheit und Fläche. Die Transportrate für den Zeitraum $t_0 - t_{30}$ wurde als Flux 1 bezeichnet. Analog dazu wurden die Fluxraten in den vier weiteren Fluxperioden berechnet. Diese Transportrate (Flux) wird im Folgenden in $nmol/(h \cdot cm^2)$ angegeben. Die Antigenzugabe (Ovalbumin $100 \mu g/ml$) erfolgte zum Zeitpunkt t_{60} . Dies bedeutet, dass die Fluxe 1 und 2 die Transportrate unter Kontrollbedingungen darstellen. Die Fluxe 3 bis 5 wurden nach der Zugabe des Antigens in die Messkammer ermittelt.

2. Material und Methoden

2.15. Statistik

Alle Daten werden als Mittelwert \pm mittlerer Fehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Zur Auswertung eines Anstieges der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration im Ca^{2+} -Imaging wurde zur Charakterisierung der Reaktion innerhalb eines Präparates ein verbundener t-Test verwendet, um den Unterschied in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vor sowie nach Zugabe der zu testenden Substanz zu erfassen. Der gleiche Test wurde bei der Auswertung der Messungen von Änderungen des Membranpotentials mittels Mikroelektrode angewendet.

Bei der Auswertung der Imaging-Experimente, in denen die Wirkung von verschiedenen Blockern ermittelt werden sollte, wurde folgendermaßen vorgegangen: auf jede Messung eines Präparates, bei der ein Blocker zugesetzt wurde, folgte eine eigene Kontrollmessung ohne Zugabe eines Blockers. So entstanden in jeder Messreihe zwei gleich große Gruppen. Ein F-Test entschied, ob die beiden Gruppen mittels unverbundenem t-Test oder Mann-Whitney-U-Test weiter verglichen wurden. Zur Auswertung der Anzahl der Responder auf einen bestimmten Wirkstoff im Ca^{2+} -Imaging wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt.

Bei der Auswertung der Ussingkammer-Messungen einschließlich der Fluoresceinflux-Messungen arbeitete ich mit einer gepoolten Kontrolle und einer one-way-ANOVA (Analysis of variance); ein nachfolgender LSD-Test (Fisher's Least Significant Difference) verglich alle Gruppen untereinander. Statistisch gesehen homogene Gruppen wurden mit dem gleichen Buchstaben markiert.

Bei allen statistischen Berechnungen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit auf $< 5\%$ festgelegt. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm WinStat® (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Deutschland) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

Das folgende Schema (Abbildung 3.1.) gibt einen Überblick über die Präparate, die für die jeweiligen Fragestellungen meiner Arbeit verwendet wurden.

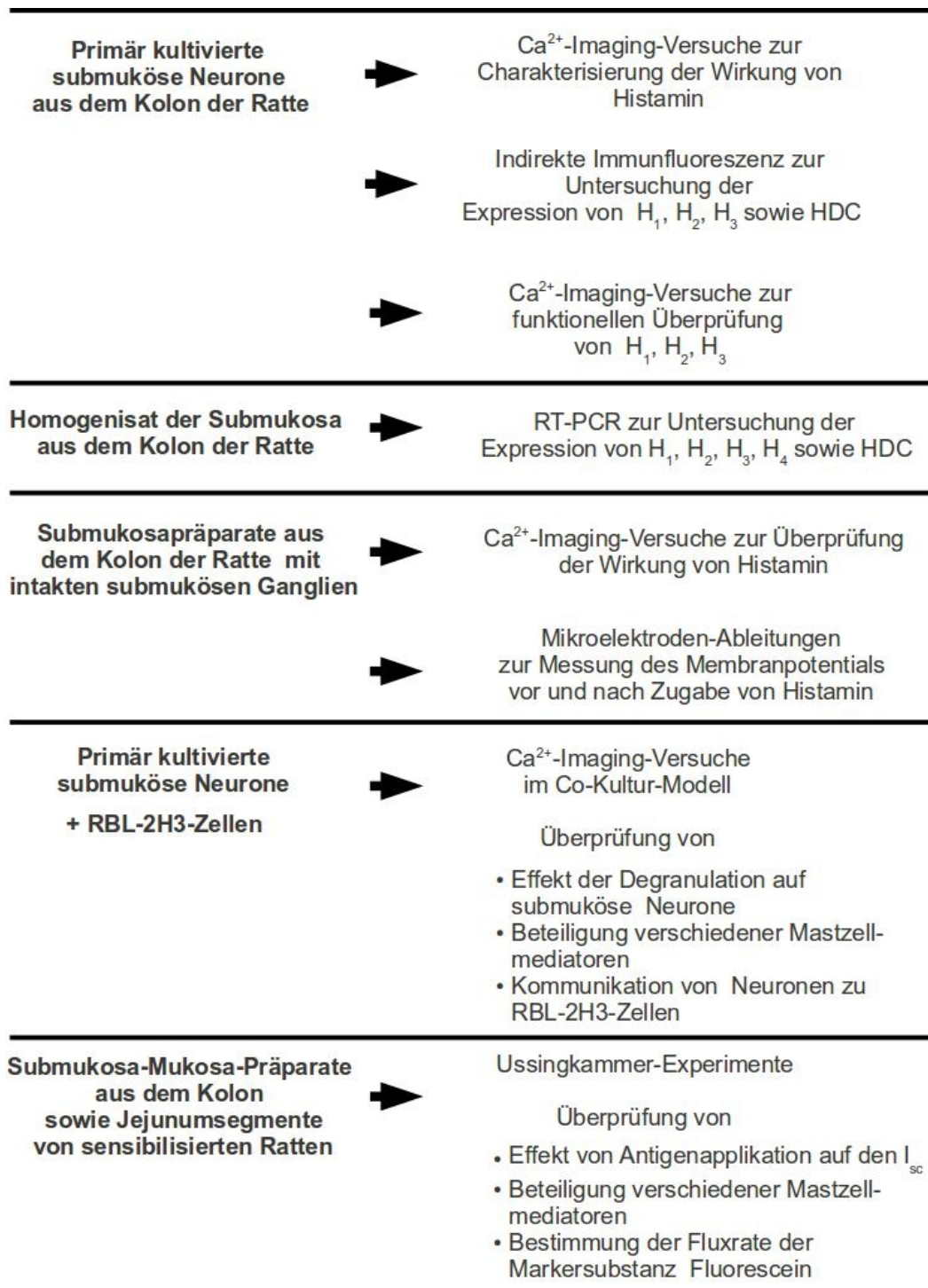


Abbildung 3.1. Überblick über die verwendeten Präparate und die durchgeführten Untersuchungen.

3.1. Untersuchung der Histaminwirkung auf Neurone des Plexus submucosus aus dem Kolon der Ratte

Um die Wirkung von Histamin auf Neurone aus dem Plexus submucosus des Kolons der Ratte zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden sowie unterschiedliche Präparate angewendet. Die Ca^{2+} -Imaging-Messungen zur Charakterisierung der Histaminwirkung erfolgten, ebenso wie die immunzytochemischen Markierungen, an isolierten, primär kultivierten Neuronen. Die primäre Zellkultur hatte zwei Vorteile gegenüber dem intakten Submukosapräparat: Die Anzahl der verwendeten Ratten konnte reduziert werden, da durch Isolierung, Vereinzelung und Kultivierung der Neurone mehr Präparate aus einem Tier hergestellt werden konnten, als dies mit intakten Submukosapräparaten der Fall gewesen wäre. Des Weiteren konnten die kultivierten Zellen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen untersucht werden, die Haltbarkeit der Submukosapräparate beträgt nur wenige Stunden. Die Zellkultur eröffnete außerdem die Möglichkeit der Co-Kultivierung der isolierten Neurone mit RBL-2H3-Zellen. Die Etablierung und Nutzung dieser Co-Kultur stellte eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit dar (siehe 3.3.).

3.1.1. Charakterisierung der Wirkung von Histamin auf Neurone der primären submukösen Zellkultur

Zur Charakterisierung der Reaktion von isolierten, primär kultivierten Neuronen des Plexus submucosus aus dem Kolon der Ratte auf Histamin wurden Ca^{2+} -Imaging-Experimente durchgeführt (siehe 2.9.). Am Ende jeder Messung wurde eine Vitalitätskontrolle durch Zugabe von Veratridin ($25 \mu\text{mol/l}$) durchgeführt. Es wurden nur Zellen ausgewertet, die auch eine positive Vitalitätskontrolle zeigten. Die Amplitude der Fura-2-Ratio aus den drei Minuten vor Zugabe von Histamin stellte die sogenannte Baseline dar. Ihr Mittelwert sowie ihre Streuung (dargestellt im folgenden als mittlerer Fehler des Mittelwerts) wurde ermittelt. Der maximale Anstieg („Peak“) der Fura-2-Ratio in Anwesenheit von Histamin wird als Differenz zu dieser Baseline (Δ_{Peak}) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1.1.1. Konzentrationsabhängige Histaminwirkung von kultivierten submukösen Neuronen

Sechs verschiedene Konzentrationen an Histamin (zwischen 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und 250 $\mu\text{mol/l}$) wurden getestet, wobei jedes Präparat nur einer Konzentration des Mediators ausgesetzt wurde, um eine Desensitivierung zu vermeiden. Es konnte eine Konzentrationsabhängigkeit für die Anzahl der Neurone, die auf Histamin reagieren, und auch für die Stärke der Reaktion, das heißt die Amplitude des Anstiegs der Fura-2-Ratio, auf Histamin nachgewiesen werden. Mit steigender Histaminkonzentration nahmen sowohl die Anzahl der reagierenden Neurone als auch die Amplitude des Fura-2-Signals zunächst zu, bis schließlich ein Plateau erreicht wurde. Während bei sehr geringen Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$ nur 2 % bzw. 12 % der untersuchten Neurone eine Reaktion auf Histamin entwickelten, reagierte ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ der überwiegende Teil der Neurone auf die Histaminapplikation. Ein ähnlicher Zusammenhang ergab sich bei Betrachtung der Amplitude des Anstiegs der Fura-2-Ratio, die bei geringen Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$ nur 0,11 bzw. 0,19 betrug, ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ jedoch etwa verdoppelt wurde, um sich dann in einer Höhe von etwa 0,5 einzupendeln.

Die Abhängigkeiten zwischen Histaminkonzentration und Responderquote bzw. Peakhöhe sind in Abbildung 3.2. dargestellt, die genauen Ergebnisse der Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve finden sich in Tabelle 3.1.. Abbildung 3.2. zeigt die konzentrationsabhängige Responderquote (A) sowie den konzentrationsabhängigen Anstieg der Fura-2-Ratio (B) auf die Zugabe von Histamin. Beide Kurven folgen näherungsweise einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Michaeliskonstante K_m gibt die Konzentration an, bei der eine halbmaximale Antwort auftritt. Sie liegt im Fall der Responderquote bei 18 $\mu\text{mol/l}$. Wird dahingegen der Anstieg der Fura-2-Ratio auf die Zugabe von Histamin betrachtet, so ist die Kurve deutlich steiler, ein Sättigungsplateau wird sehr schnell erreicht.

3. Ergebnisse

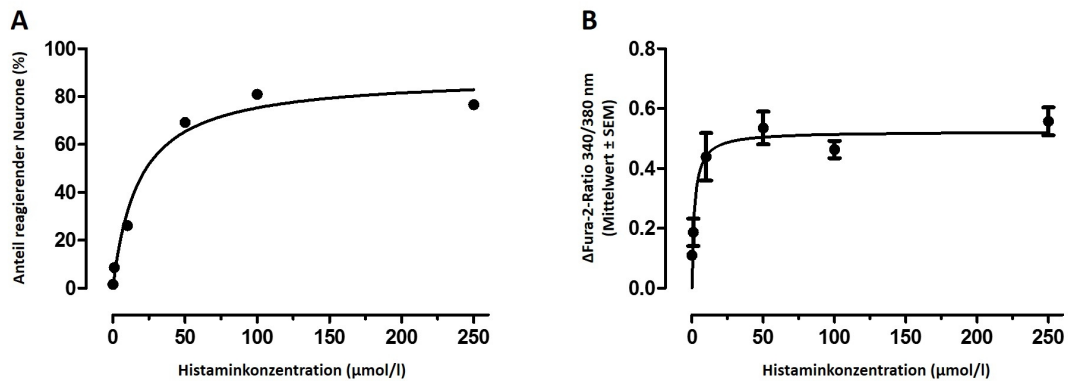


Abbildung 3.2. Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Reaktion von isolierten submukösen Neuronen in Zellkultur auf Histamin. Angegeben ist der Prozentsatz der reagierenden Neurone (A) bzw. der Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals über die Baseline (Δ Fura-2-Ratio) bei den Respondern (B). Werte sind Mittelwerte (\pm SEM im Fall der Abbildung B), $n = 60 - 100$. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

Histamin-konzentration (µmol/l)	Anteil reagierender Neurone (%)	Reagierende Neurone mit zwei Peaks (%)	Δ Fura-2-Ratio während Peak 1 bei den Respondern (Mittelwert \pm SEM)	Anzahl untersuchter vitaler Neurone
0,1	2	0	0,11 \pm 0,014	61
1	12	2	0,19 \pm 0,046	60
10	26	14	0,45 \pm 0,084	65
50	69	29	0,53 \pm 0,057	65
100	81	62	0,46 \pm 0,029	100
250	77	61	0,56 \pm 0,047	94

Tabelle 3.1. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von isolierten submukösen Neuronen in Zellkultur auf Histamin. Angegeben ist der Prozentsatz der vitalen Neurone, welche eine Antwort auf Histamin zeigten (erste Spalte), der Anteil der Neurone mit biphasischer Antwort (zweite Spalte) sowie der Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals bei den Respondern (Δ Fura-2-Ratio) über die Baseline, den Histamin während des ersten Peaks hervorrief (dritte Spalte).

3. Ergebnisse

Ein Originaltracing, welches eine typische Reaktion eines kultivierten, submukösen Neurons auf Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) zeigt, ist in Abbildung 3.3. dargestellt. Bei Betrachtung dieser Abbildung wird deutlich, dass Histamin eine biphasische Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auslöst. Ein initialer Peak mit größerer Amplitude wird unmittelbar nach der Zugabe von Histamin ausgebildet. Er erreicht nach etwa einer Minute seinen höchsten Wert und fällt dann wieder ab. Nach zwei bis drei Minuten kann ein zweiter Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beobachtet werden. Dieser weist jedoch eine deutlich geringere Amplitude von durchschnittlich $0,26 \pm 0,028$ (ausgedrückt als Anstieg der Fura-2-Ratio) auf und war auch nicht bei allen untersuchten Zellen zu beobachten. Die Auswertung der Daten zur Konzentrations-Wirkungs-Kurve ergab, dass auch die Ausbildung eines zweiten Peaks konzentrationsabhängig ausfiel. Ab einer Histaminkonzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ kam es bei etwa einem Drittel der untersuchten Neurone zur Ausbildung eines zweiten Peaks, in höheren Konzentrationen (100 $\mu\text{mol/l}$ und 250 $\mu\text{mol/l}$) waren es etwa zwei Drittel der untersuchten Zellen. Die genauen Werte hierzu sind in Tabelle 3.1. aufgeführt.

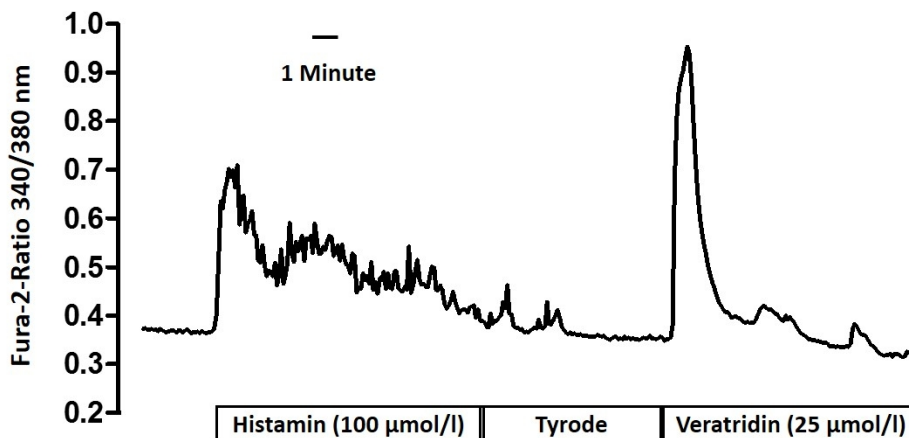


Abbildung 3.3. Repräsentatives Originaltracing der Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (gemessen als Fura-2-Ratio) eines isolierten submukösen Neurons in Zellkultur auf Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) und Veratridin (25 $\mu\text{mol/l}$) als Vitalitätskontrolle am Ende der Messung. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3. Ergebnisse

Da bei einer Histaminkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ der größte Anteil an Respondern, sowohl mit einem als auch mit zwei Peaks, gemessen wurde (siehe Abbildung 3.4.) und außerdem die Größe der Reaktion eine geringe Streuung mit einem Standardfehler von 0,029 aufwies, wurde diese Konzentration im Folgenden als Arbeitskonzentration gewählt.

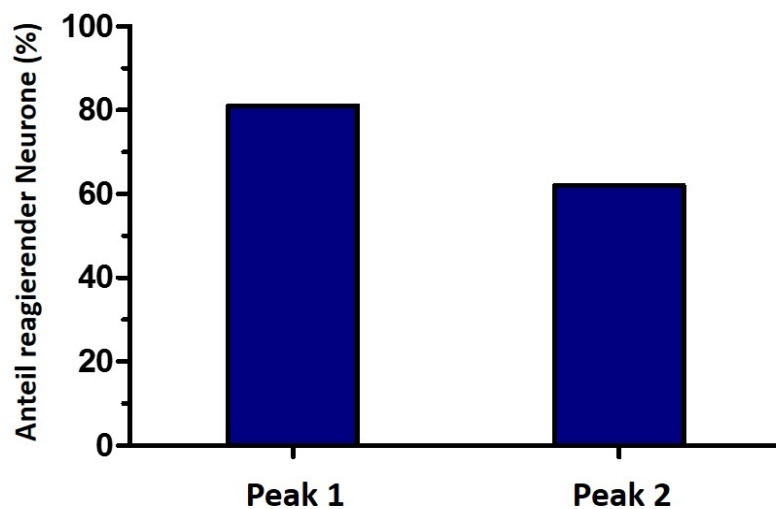


Abbildung 3.4. Anteil der auf Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) mit einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reagierenden isolierten submukösen Neurone in Zellkultur, Darstellung der Häufigkeit der Ausprägung des Peak 1 und des nicht konsistent zu beobachtenden Peak 2; $n=100$.

Um zu testen, ob Histamin eine Desensitivierung der submukösen Neurone auslöst, erfolgten Versuche, bei denen nach der ersten Zugabe von Histamin eine mindestens zehnminütige Perfusion mit Tyrode erfolgte. Erst nachdem eine stabile Baseline für mindestens fünf Minuten zu beobachten war, wurde Histamin (Konzentration in der Messkammer: 100 $\mu\text{mol/l}$) erneut in die Messkammer pipettiert und die Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verfolgt. Eine Reaktion war auch nach der zweiten Applikation von Histamin zu beobachten, allerdings waren sowohl der Anteil der reagierenden Zellen als auch die Höhe der Amplitude der Fura-2-Ratio deutlich reduziert ($n = 32$, Daten nicht gezeigt). Es kommt also zu einer Desensitivierung.

3. Ergebnisse

Aus diesem Grund wurden in allen funktionellen Experimenten, in denen die Wirkung eines Inhibitors untersucht werden sollte, Messungen unter Verwendung des Blockers und Kontrollmessungen ohne Blocker alternierend durchgeführt. Für jedes untersuchte Glasplättchen unter Versuchsbedingungen wurde ein Glasplättchen unter Kontrollbedingungen untersucht, welches Zellen trug, die aus demselben Tier stammten.

3.1.1.2. Der Einfluss von Tetrodotoxin auf die Histaminwirkung

Um zu überprüfen, ob eine Weiterleitung von Aktionspotentialen notwendig ist, damit die submukösen Neurone auf Histamin reagieren, wurde das Neurotoxin Tetrodotoxin verwendet. Tetrodotoxin blockiert spannungsabhängige Natriumkanäle, welche zur Ausbildung von Aktionspotentialen benötigt werden (Catterall 1980).

Tetrodotoxin ($1 \mu\text{mol/l}$) wurde hierfür 10 Minuten vor der Histamingabe in die Messkammer pipettiert. In der Versuchsgruppe reagierten von 70 submukösen Neuronen aus vier verschiedenen Tieren 39 auf Histamin, der durchschnittliche Anstieg der Fura-2-Ratio betrug dabei $0,47 \pm 0,06$. In der Kontrollgruppe, d.h. in Abwesenheit von Tetrodotoxin, reagierten 40 von 73 untersuchten Neuronen. Die durchschnittliche Peakhöhe betrug hier $0,32 \pm 0,028$. Beide Gruppen waren statistisch weder in Bezug auf die Anzahl der Responder noch in Bezug auf die Peakhöhe voneinander verschieden. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Weiterleitung von Aktionspotentialen für die Antwort auf Histamin nicht erforderlich ist.

3.1.1.3. Identifizierung der Calciumquelle für die Histaminwirkung

Um zu überprüfen, ob der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, den Histamin hervorruft, auf einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} zurückgeht, wurde die Wirkung des Mediators in einer Ca^{2+} -freien Tyrode getestet und mit der Antwort auf Histamin in einer Ca^{2+} -haltigen Tyrode verglichen. Unter Ca^{2+} -freien Bedingungen wurde weder der Anteil der reagierenden Neurone auf Histamin noch die Amplitude der Fura-2-Ratio reduziert. Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 3.2. sowie Abbildung 3.5. dargestellt. Ein vermehrter Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle als Reaktion auf Histamin scheint also nicht stattzufinden.

3. Ergebnisse

Bei detaillierter Betrachtung der Messungen unter Ca^{2+} -freien Bedingungen fiel folgendes auf: die Ausprägung eines zweiten Peaks (siehe 3.1.1.1.), konnte unter Ca^{2+} -freien Bedingungen nur noch in 4 % der untersuchten Neurone beobachtet werden. In den Kontrollmessungen lag der Anteil an Neuronen, die einen zweiten Peak ausbildeten, hingegen bei 38 %. Die Anzahl der Responder mit einem zweiten Peak ist unter Ca^{2+} -freien Bedingungen statistisch signifikant reduziert (Chi^2 -Test, $p < 0,05$). Ein typisches Originaltracing der Reaktion eines submukösen Neurons auf Histamin unter Ca^{2+} -freien Bedingungen sowie der Vergleich der Responder auf Histamin unter Ca^{2+} -freien Bedingungen sowie Kontrollbedingungen sind in Abbildung 3.5. dargestellt. Auch die Größe des zweiten Peaks fiel unter Ca^{2+} -freien Bedingungen mit einem Mittelwert von $0,15 \pm 0,020$ geringer aus als der Mittelwert von $0,29 \pm 0,036$ in der Kontrollgruppe, hier wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.

	Anzahl untersuchter vitaler Neurone		Anteil der auf Histamin reagierenden Neurone (%)		Δ Fura-2-Ratio der Responder während Peak 1 (Mittelwert \pm SEM)	
	-	+	-	+	-	+
$\pm \text{Ca}^{2+}$ -freie Tyrode	65	64	73	64	$0,45 \pm 0,058$	$0,44 \pm 0,049$
$\pm \text{CPA}$	87	71	48	7*	$0,30 \pm 0,038$	Paradoxer Abfall (s. Abbildung 3.6./3.7.)
$\pm 2\text{-APB}$	81	62	57	18*	$0,83 \pm 0,176$	$0,23 \pm 0,023^*$
$\pm \text{Gd}^{3+}$	32	38	84	79	$0,37 \pm 0,033$	$0,45 \pm 0,028$

*Tabelle 3.2. Ergebnisse zu den Versuchen zur Ermittlung der Calciumquelle bei der Antwort auf Histamin. Die Wirkung von Histamin ($100 \mu\text{mol/l}$) wurde an isolierten submukösen Neuronen in Zellkultur in Anwesenheit (+) der angegebenen Hemmstoffe (bzw. unter Ca^{2+} -freien Bedingungen) durchgeführt und mit der Antwort unter Kontrollbedingungen in Abwesenheit der entsprechenden Blocker (-) verglichen. Die Hemmstoffkonzentrationen betrugen: Cyclopiazonsäure (CPA): $10 \mu\text{mol/l}$, 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB): $100 \mu\text{mol/l}$, Gd^{3+} : $5 \mu\text{mol/l}$; * $p < 0,05$ im Vergleich zur Antwort auf Histamin unter Kontrollbedingungen.*

3. Ergebnisse

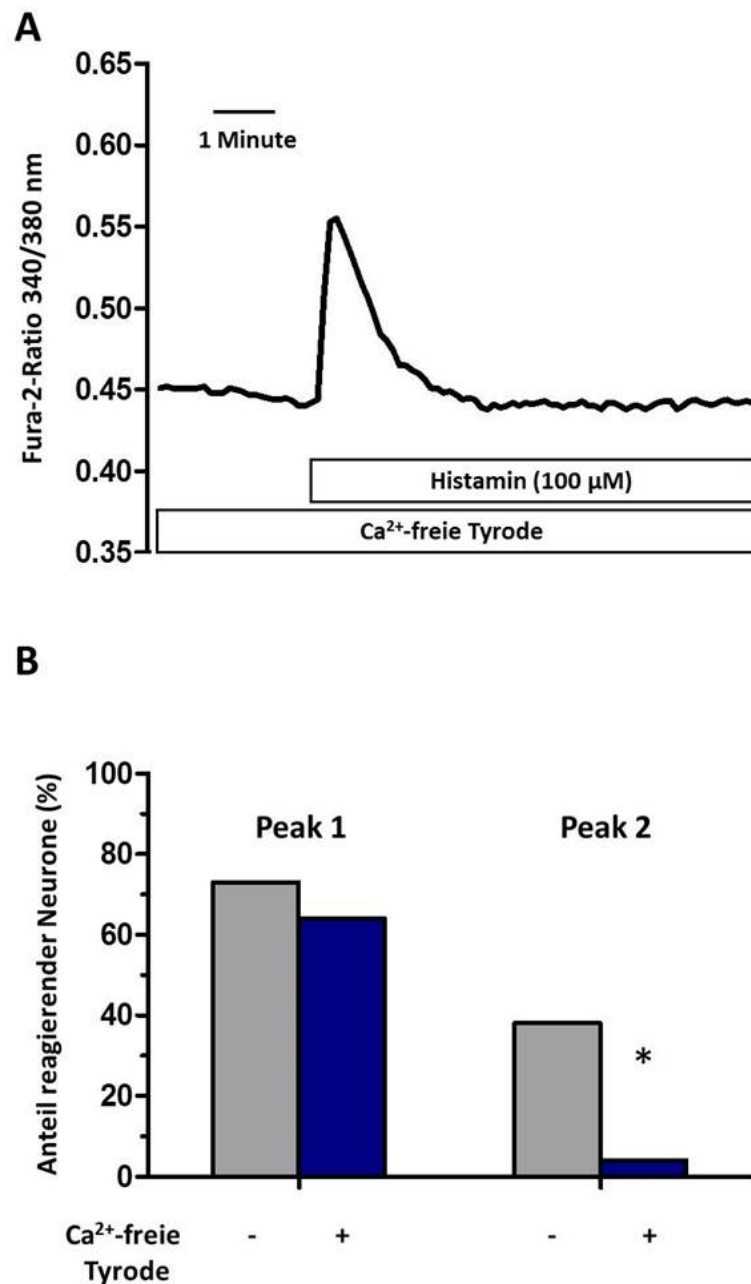


Abbildung 3.5. Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (erfasst als Fura-2-Ratio) isolierter submuköser Neurone in Zellkultur auf Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) unter Ca^{2+} -freien Bedingungen (+) im Vergleich zur Kontrollsituation (-), d.h. mit Ca^{2+} im Extrazellulärraum. A: Repräsentatives Originaltracing; B: Anteil der reagierenden Neurone mit Ausprägung eines Peak 1 sowie eines Peak 2. $n = 64-65$; * $p < 0,05$ im Vergleich zur Antwort auf Histamin unter Kontrollbedingungen. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3. Ergebnisse

Da ein Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum für die initiale Antwort auf Histamin keine Rolle zu spielen scheint, werden die Calciumionen vermutlich aus intrazellulären Speichern in das Zytosol abgegeben. Cyclopiazonsäure (CPA) blockiert die Calciumpumpe des endoplasmatischen Retikulums (SERCA = sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) und damit die Adenosintriphosphat(ATP)-abhängige Aufnahme von Calciumionen in diesen intrazellulären Speicher (Moncoq et al. 2007). Eine Vorbehandlung von Zellen mit Cyclopiazonsäure führt damit zu einer Ca^{2+} -Speicherentleerung, da der Mechanismus zur Wiederaufnahme außer Kraft gesetzt ist. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration steigt dementsprechend zunächst kontinuierlich an, bis sich durch die vollständig geleerten internen Speicher erneut ein Gleichgewicht einstellt und die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration konstant bleibt. Es erfolgte eine Superfusion mit Cyclopiazonsäure (10 $\mu\text{mol/l}$), bis eine für mindestens fünf Minuten bestehende Stabilisierung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beobachtet werden konnte. Danach erfolgte die Applikation von Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$). Für jeden Versuch wurde auch eine Messung unter Kontrollbedingungen angefertigt. Die Responderquote unter Kontrollbedingungen betrug 48 %, nach Vorbehandlung mit Cyclopiazonsäure fiel diese statistisch signifikant auf 7 % ab ($p < 0,05$). Außerdem wurde die Antwort auf Histamin durch Cyclopiazonsäure in einen paradoxen Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration umgekehrt (siehe hierzu 3.1.1.4.).

Dieses Ergebnis scheint die Vermutung, dass Calciumionen als Reaktion auf Histamin aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol freigesetzt werden, zu bestätigen.

3. Ergebnisse

2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) ist ein Antagonist der Rezeptoren für Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3), die vorwiegend intrazellulär an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind. Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Freisetzung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum, welches als intrazellulärer Calciumspeicher dient (Maruyama et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde 2-APB verwendet, um herauszufinden, ob ein klassischer G_q -Protein-gekoppelter Signaltransduktionsweg der Wirkung von Histamin zugrunde liegt. Bei diesem kommt es durch Aktivierung des G-Proteins zur Stimulation der Phospholipase C. Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), das sich an der Innenseite der Zellmembran befindet, in IP_3 und Diacylglycerol (DAG). Inositoltrisphosphat kann nun nach Bindung an seine Rezeptoren eine Ca^{2+} -Freisetzung in das Zytosol aus intrazellulären Speichern auslösen.

Um eine Blockade der IP_3 -Rezeptoren mit 2-APB in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten zu erreichen, wurde zunächst eine zehnminütige Inkubation mit 2-APB in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ vorgenommen, bevor die Zugabe von Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) in die Messkammer erfolgte. Für jeden Versuch wurde eine Messung unter Kontrollbedingungen durchgeführt. Durch die Blockade der IP_3 -Rezeptoren wurde der Anteil der auf Histamin reagierenden Neurone statistisch signifikant von 57 % auf 18 % gesenkt. Eine Reduktion der Amplitude der Fura-2-Ratio konnte ebenfalls verzeichnet werden. Diese betrug in den Kontrollmessungen im Mittel $0,83 \pm 0,176$, in den Versuchen mit 2-APB nur noch $0,23 \pm 0,023$ ($p < 0,05$). Die Freisetzung der Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum scheint also IP_3 -vermittelt zu erfolgen. Die Tatsache, dass durch den Einsatz von 2-APB keine vollständige Blockade der Reaktion erreicht werden konnte, könnte zum einen auf eine unzureichende Blockade der IP_3 -Rezeptoren oder zum anderen auf die Beteiligung weiterer Rezeptoren hindeuten.

3. Ergebnisse

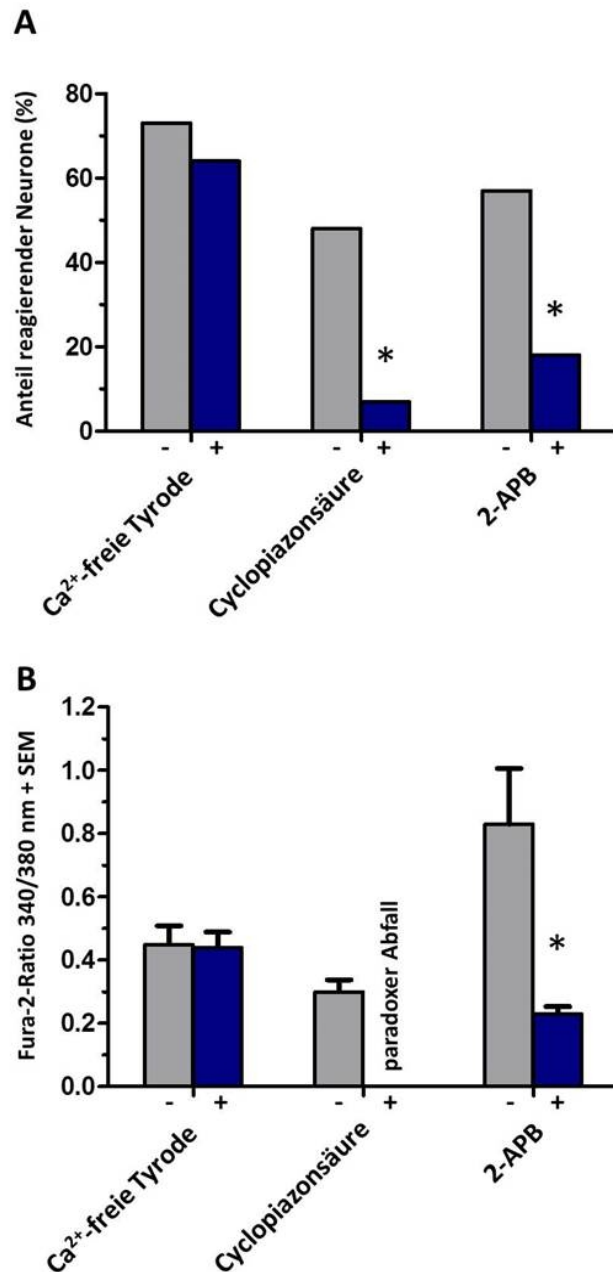


Abbildung 3.6. Grafische Zusammenfassung der Versuche zur Identifizierung der Calciumquelle für die Antwort auf Histamin in isolierten submukösen Neuronen in Zellkultur. Die Wirkung von Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) wurde in Anwesenheit (+) der angegebenen Hemmstoffe (bzw. unter Ca²⁺-freien Bedingungen) gemessen und mit der Antwort unter Kontrollbedingungen, d.h. in Abwesenheit der entsprechenden Blocker (-) verglichen. A: Anteil der Responder auf Histamin. B: Anstieg des Fura-2-Signals auf Histamin bei den Respondern (Mittelwert + SEM). Die Hemmstoffkonzentrationen betrugen: Cyclopiazonsäure (CPA) 10 $\mu\text{mol/l}$, 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB): 100 $\mu\text{mol/l}$; n=62-87; *p < 0,05 im Vergleich zur Antwort unter Kontrollbedingungen.

3. Ergebnisse

Die Entleerung von Ca^{2+} -Speichern führt an vielen Zellen zu einem verzögerten Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum über speichergesteuerte Kationenkanäle, die sich z.B. durch Lanthanide wie etwa Gd^{3+} blockieren lassen (Parekh und Penner 1997). Daher wurde getestet, ob sich der zweite Peak der Antwort auf Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$), der von der Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} abhängig ist (siehe oben), durch Vorbehandlung mit Gadolinium (5 $\mu\text{mol/l}$) hemmen lässt. Nach Inkubation mit Gd^{3+} war bei keinem einzigen der untersuchten Neurone ein zweiter Peak zu beobachten, während in parallel durchgeführten Kontrollmessungen 25 % der Neurone einen zweiten Peak aufwiesen. Die weiteren Daten hierzu sind in Tabelle 3.2. aufgeführt.

Insgesamt scheint der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als Reaktion auf Histamin, welcher in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten beobachtet werden kann, zunächst durch die Freisetzung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum IP_3 -vermittelt zu erfolgen. Die Ausprägung des zweiten Peaks entsteht dagegen vermutlich durch einen Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum.

3.1.1.4. Die Untersuchung des paradoxen Histamineffektes in Gegenwart von Cyclopiazonsäure

Bei einem großen Anteil der untersuchten submukösen Neurone (93 %) war der Anstieg der Amplitude der Fura-2-Ratio, den Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) normalerweise hervorruft, nach Vorbehandlung mit Cyclopiazonsäure (10 $\mu\text{mol/l}$) nicht nur komplett unterdrückt, sondern sogar in einen paradoxen Abfall umgekehrt (Abbildung 3.7.). Dieser Abfall betrug durchschnittlich $0,47 \pm 0,037$ ($n = 71$) ($p < 0,05$ im Vergleich zur Baseline). Die Abnahme des Fura-2-Ratio-Signals ist gleichbedeutend mit einer Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.

3. Ergebnisse

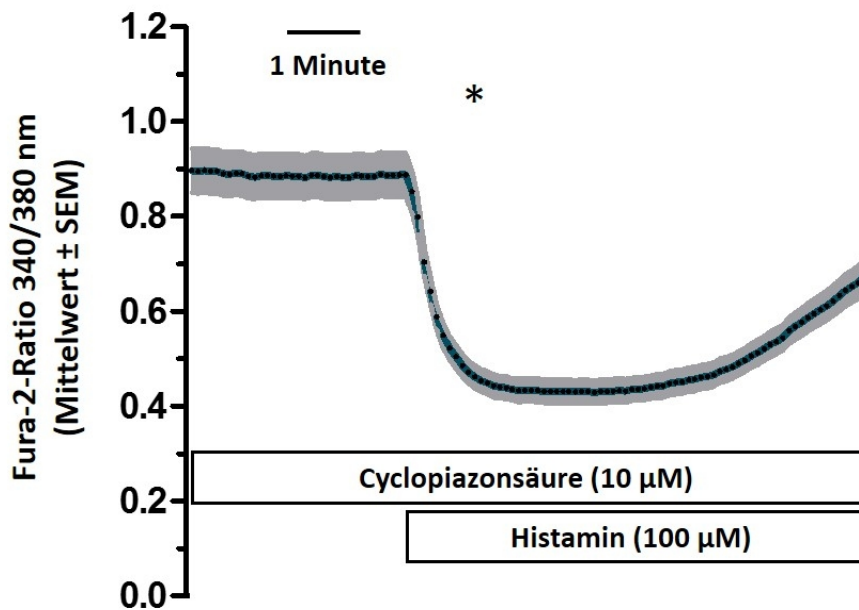


Abbildung 3.7. Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (gemessen als Fura-2-Ratio) isolierter submuköser Neurone in Zellkultur auf Histamin ($100 \mu\text{mol/l}$) nach Inkubation mit Cyclopiazonsäure ($10 \mu\text{mol/l}$); Mittelwert (Linie) \pm SEM (graues Feld); $n=71$; $*p<0,05$ im Vergleich zur Baseline. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

Da der Transport der Calciumionen in den internen Speicher (endoplasmatisches Retikulum) aufgrund der SERCA-Blockade ausgeschlossen werden kann, bleiben zwei Möglichkeiten zum Verbleib der Calciumionen: Ein Ausschleusen in den Extrazellulärraum oder der Transport in die Mitochondrien, einen weiteren intrazellulären Calciumspeicher (Bygrave 1978).

Calciumionen können nur aktiv aus Zellen exportiert werden. Ein passiver Ausstrom über Kationenkanäle kommt für den Transport von Calciumionen aus dem Zellinneren in den Extrazellulärraum nicht infrage, da dies einem Transport gegen das Konzentrationsgefälle entsprechen würde. Ein denkbarer Transportmechanismus wäre die Nutzung des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers in der Plasmamembran (Blaustein und Lederer 1999). Um zu überprüfen, ob Ca^{2+} im Austausch gegen Na^+ aus der Zelle transportiert wird, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, bei der die bisher verwendete Tyrode durch Na^+ -freie Tyrode ersetzt wurde (siehe 2.3.1.4.). Unter Na^+ -freien Bedingun-

3. Ergebnisse

gen, vergleichbar zu den Ergebnissen unter Kontrollbedingungen, zeigten 94 % der untersuchten Zellen (n=63) als Antwort auf Histamin einen Abfall der Fura-2-Ratio. Dieser Abfall der Amplitude der Fura-2-Ratio lag mit durchschnittlich $0,33 \pm 0,022$ ($p < 0,05$ im Vergleich zur Baseline; $p < 0,05$ im Vergleich zum Abfall der Fura-2-Ratio unter Kontrollbedingungen) jedoch signifikant niedriger als in den Messungen unter Kontrollbedingungen, welche im Mittel einen Abfall der Amplitude um $0,47 \pm 0,037$ (n=71) ergaben.

Die Ergebnisse lassen eine Beteiligung des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers am Transport von Calciumionen aus dem Zytosol vermuten. Da dieser Ausstrom jedoch, wenn auch vermindert, auch noch unter Na^+ -freien Bedingungen stattfindet, müssen weitere Transportmechanismen, beispielsweise Ca^{2+} -ATPasen in der Plasmamembran, involviert sein. In Ermangelung selektiver Antagonisten wurde die Versuchsreihe hierzu jedoch nicht fortgeführt.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich ein Export von Ca^{2+} aus dem Zytosol der submukösen Neurone als Reaktion auf die Applikation von Histamin stattfindet, wurde ein sogenannter Mangan-Quench-Versuch durchgeführt. Manganionen werden von den meisten Ca^{2+} -Transportern bzw. -Kanälen als Substrat akzeptiert, führen in der Zelle dann aber zu einer Verminderung (Quench) der Fura-2-Fluoreszenz, indem sie an Fura-2-Moleküle binden, wodurch Fura-2 seine Fluoreszenz verliert (Hallam et al. 1988).

Bei diesem abgewandelten Messprotokoll wurden die zu untersuchenden Zellen ebenfalls mit dem Farbstoff Fura-2 aufgeladen, es wurde jedoch nicht die Fura-2-Ratio bestimmt, sondern es fand lediglich die Erfassung des Fura-2-Signals bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm statt. Die Wellenlänge von 360 nm liegt sehr nah am isoemissiven Punkt des Farbstoffs Fura-2, das Fura-2-Signal ist also unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration (siehe 2.9.1.). Während des gesamten Versuchs wurde die Messkammer mit einer Manganchlorid-Lösung (500 $\mu\text{mol/l}$) perfundiert.

3. Ergebnisse

Wie erwartet, nimmt das Fura-2-Signal bei der Superfusion der Zellen mit Mn^{2+} kontinuierlich ab (Abbildung 3.8.). Die Applikation von Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) erzeugte eine Zunahme des gemessenen Fura-2-Signals. Diese Zunahme konnte bei 88 % aller gemessenen Neurone ($n = 42$) verzeichnet werden und betrug im Mittel $0,11 \pm 0,039$. Die Zunahme des Fura-2-Signals als Antwort auf Histamin spricht für eine Bewegung von Calciumionen (und damit auch Manganionen) aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum, so dass weniger Fura-2-Moleküle durch Mn^{2+} gequenchet werden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Histamin einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern hervorruft (siehe 3.1.1.3.). Diese Antwort wird teilweise vermindert durch die gleichzeitige Stimulation eines Ca^{2+} -Efflux-Weges, der demaskiert wird, wenn die Freisetzung von Ca^{2+} aus Speichern durch SERCA-Blockade unterdrückt wird.

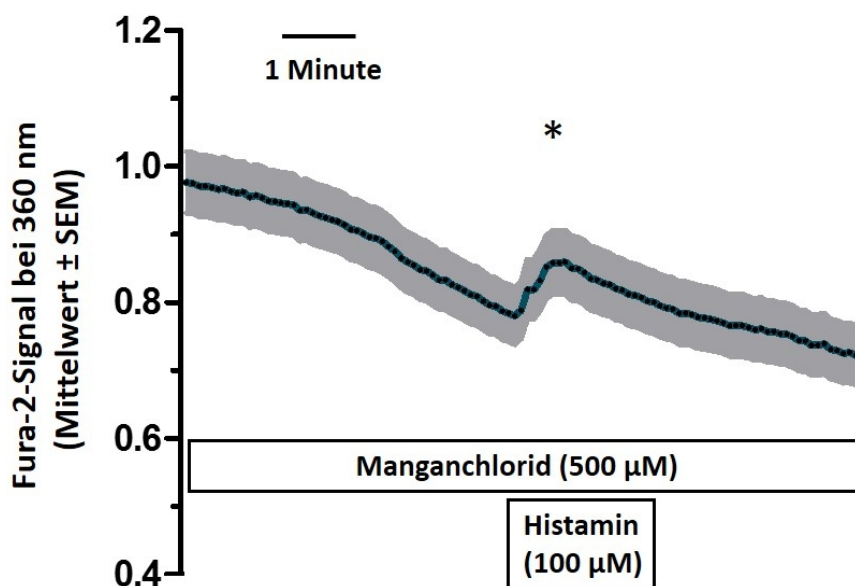


Abbildung 3.8. Änderung der Fura-2-Fluoreszenz (gemessen am isoemissiven Punkt) von isolierten submukösen Neuronen in Zellkultur auf Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) nach Inkubation mit Manganchlorid (500 $\mu\text{mol/l}$); Mittelwert (Linie) \pm SEM (graue Fläche); $n=42$; $*p<0,05$ im Vergleich zur Baseline.

3. Ergebnisse

3.1.2. Identifizierung der beteiligten Histaminrezeptoren

Es werden klassischerweise drei Histaminrezeptor-Subtypen beschrieben, die als H₁, H₂ und H₃ bezeichnet werden (Hill et al. 1997), dazu kommt noch ein vierter, noch nicht lange bekannter Subtyp, der H₄-Rezeptor (Leurs et al. 2009). Um die Histaminrezeptor-Subtypen, über welche Histamin einen Anstieg der zytolischen Ca²⁺-Konzentration an submukösen Neuronen auslöst, zu identifizieren, wurde zunächst eine RT-PCR aus einem Isolat homogenisierter Submukosa durchgeführt. Diese ermöglichte ein erstes Screening in Bezug auf die Expression der vier Rezeptorsubtypen in der Submukosa des Kolons der Ratte. Da durch die Nutzung eines Homogenats der gesamten Submukosa jedoch anhand dieses Screenings keine Aussage über die tatsächliche neuronale Expression getroffen werden konnte, wurden nachfolgend immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Es folgten Ca²⁺-Imaging-Experimente mit Agonisten und Antagonisten von Histaminrezeptoren, um die funktionelle Bedeutung der molekularbiologisch bzw. immunzytochemisch nachgewiesenen Rezeptortypen abzuklären.

3.1.2.1. RT-PCR

Um einen ersten Überblick über die Expression von Histaminrezeptoren in der Submukosa des Kolons der Ratte zu gewinnen, wurde eine reverse Transkription mit nachfolgender PCR aus RNA isolierter Submukosa durchgeführt (siehe 2.11.2. - 2.11.5.). Es wurden Primer für die Histaminrezeptor-Subtypen H₁, H₂, H₃ und H₄ eingesetzt. Als interne Kontrolle wurde ein Primer für das housekeeping gene GAPDH verwendet. Außerdem wurden zwei verschiedene Negativkontrollen mitgeführt. Bei der ersten Negativkontrolle wurde anstatt der cDNA nur RNase-freies Wasser eingesetzt, die zweite Negativkontrolle erhielt anstelle der cDNA das Produkt aus der Negativkontrolle der RT (siehe hierzu auch 2.11.4.).

Abbildung 3.9. zeigt ein Foto eines Agarosegels, bei dem die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Es handelt sich um die Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses aus drei unabhängig voneinander angefertigten Experimenten. Es sind deutliche Banden in der erwarteten Produktgröße bei Einsatz der Primer für den H₁-Rezeptor, den H₂-Rezeptor und den H₃-Rezeptor zu sehen

3. Ergebnisse

(vergleiche Abbildung 3.9.). Für den H₄-Rezeptor hingegen konnte kein Transkript gefunden werden.

Das Ergebnis spricht für eine Expression der Histaminrezeptor-Subtypen H₁, H₂ und H₃, nicht aber des Subtyps H₄ in isolierter Submukosa. Hierbei ist zu beachten, dass die verwendete RNA aus der gesamten Submukosa gewonnen wurde, in der neben den submukösen Ganglien auch andere Bestandteile, wie zum Beispiel Fibroblasten oder Gefäße, vorhanden sind. Es kann also keine Aussage über die neuronale Expression getroffen werden. Da keine mRNA für den H₄-Rezeptor in der Submukosa nachweisbar war, wurde in den nachfolgenden Experimenten auf die Überprüfung der Beteiligung von H₄-Rezeptoren verzichtet.

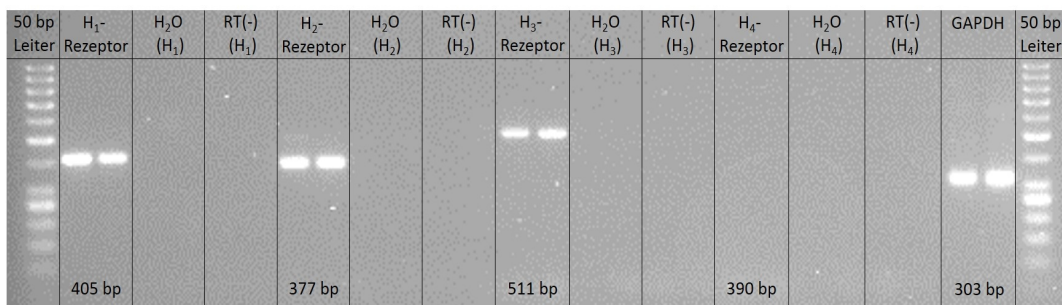


Abbildung 3.9. Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte nach erfolgter PCR aus isolierter RNA der Submukosa unter Verwendung von Primern gegen die Histaminrezeptoren H₁, H₂, H₃ und H₄ sowie GAPDH; repräsentatives Bild eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. RT(-): RNase-freies Wasser anstelle von RNA in der RT und Produkt aus dieser Reaktion in der PCR eingesetzt, H₂O: RNase-freies Wasser anstelle von cDNA in der PCR. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3. Ergebnisse

3.1.2.2. Immunzytochemische Doppelmarkierungen

Um zu prüfen, ob die auf mRNA-Ebene in der Submukosa nachgewiesene Expression der Histaminrezeptor-Subtypen H₁, H₂ und H₃ in Neuronen des Plexus submucosus erfolgt, wurden immunzytochemische Markierungen mit spezifischen, gegen die Histaminrezeptor-Subtypen H₁, H₂ und H₃ gerichteten Antikörpern angefertigt. In jedem Experiment wurde zusätzlich der neuronale Marker MAP2 (microtubule-associated protein 2) verwendet, um die Erkennung einer neuronalen Lokalisation der Rezeptorsubtypen zu ermöglichen.

Abbildung 3.10. zeigt repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei separat durchgeführten Experimenten. Der neuronale Marker MAP2 ist in jedem Experiment in grüner Farbe dargestellt, das Signal für die Bindung des Antikörpers am Histamin-Rezeptor-Subtyp zeigt sich in rot. Es ist eine deutliche Rotfärbung im Bereich der Neurone bei Verwendung der spezifischen Antikörper gegen den H₁-Rezeptor, den H₂-Rezeptor und auch gegen den H₃-Rezeptor zu erkennen. Die überlagernde Darstellung beider Einzelbilder, bei der auch die Kernfärbung mit DAPI dargestellt ist, führt zu einem gelblichen Aussehen der Neurone, welches durch die Überlagerung des grünen und roten Signals entsteht. Um eine unspezifische Bindung des verwendeten Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle ohne Zugabe des Primärantikörpers durchgeführt (siehe Abbildung 3.10.). Als weitere Negativkontrolle wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt (nicht dargestellt). Bei keiner der Negativkontrollen entstanden Signale (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

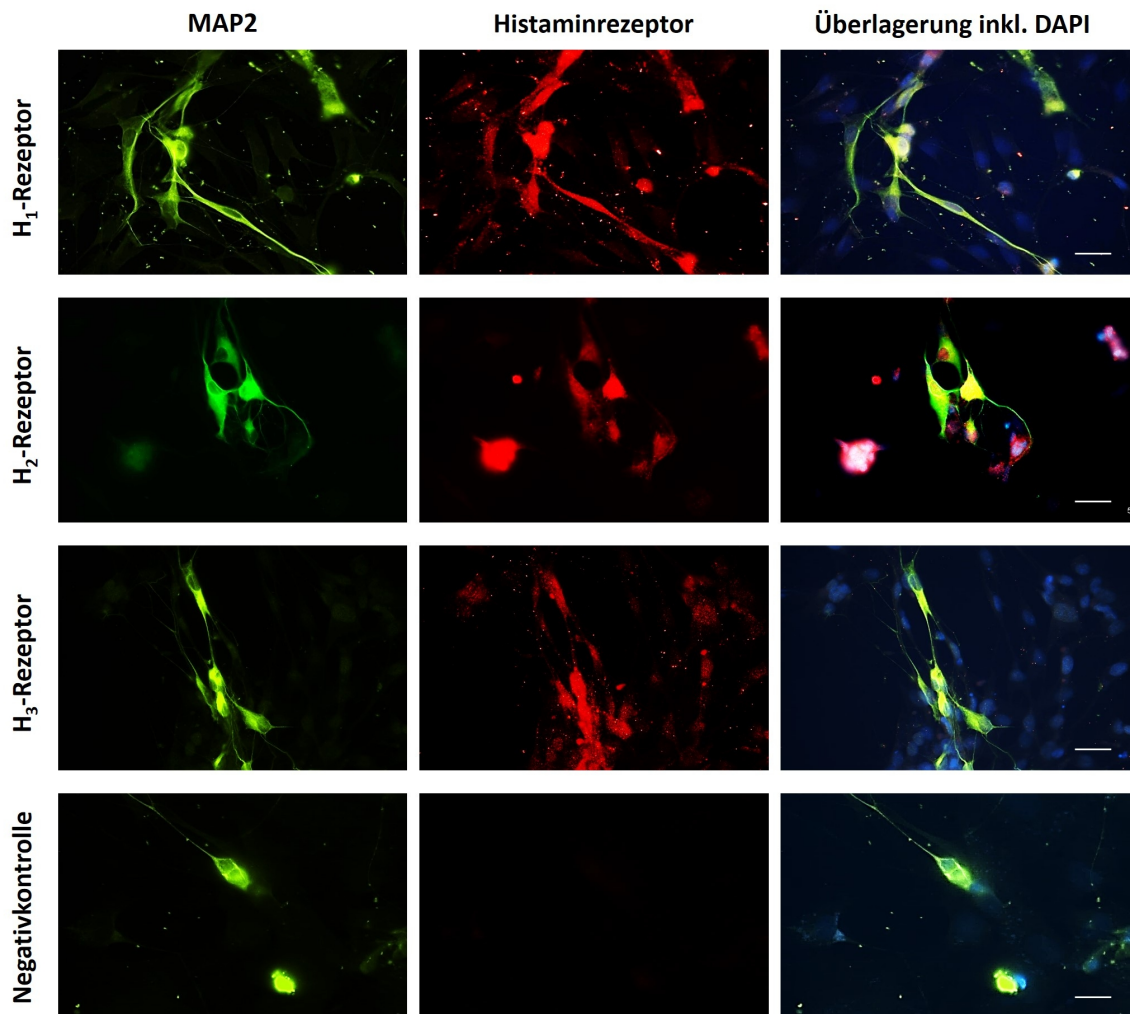


Abbildung 3.10. Immunzytochemische Doppelmarkierungen isolierter submuköser Neurone in Zellkultur gegen die Histaminrezeptoren H₁, H₂ und H₃. Repräsentative Darstellung eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten; Eichbalken: 20 µm. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3. Ergebnisse

3.1.2.3. Funktionelle Identifizierung mittels Agonisten

Um herauszufinden, ob die Reaktion submuköser Neurone auf Histamin durch Subtyp-selektive Rezeptoragonisten initiiert werden kann, wurden Ca^{2+} -Imaging-Experimente durchgeführt. Anstatt einer Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ Histamin erfolgte hierbei eine Applikation des entsprechenden Histaminrezeptor-Agonisten in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$. Für eine Übersicht der verwendeten Substanzen siehe Hill et al. 1997 und Stark 2007.

Der Agonist Trifluoromethylphenylhistamin (TMPH), der den H_1 -Rezeptor aktiviert, konnte in 66 % der untersuchten Neurone einen Anstieg der Fura-2-Ratio hervorrufen, die im Mittel $0,46 \pm 0,051$ betrug (Abbildung 3.11.). Sowohl der Anteil der Responder als auch die Höhe des gemessenen Peaks entsprechen damit in etwa den Daten der Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei einer Histaminkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$. Auch der H_2 -Rezeptor-Agonist Amthamin und der H_3 -Rezeptor-Agonist R- α -Methylhistamin konnten einen Ca^{2+} -Peak bei einem Großteil der untersuchten Neurone hervorrufen. Allerdings fielen hier der Anteil der Responder sowie die Höhe des gemessenen Peaks etwas geringer aus als bei Verwendung des H_1 -Agonisten TMPH. Die Daten sind in Tabelle 3.3. aufgeführt.

Die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe zeigen, dass alle drei molekularbiologisch (Abbildung 3.9.) bzw. immunzytochemisch (Abbildung 3.10.) nachgewiesenen Histaminrezeptor-Subtypen auch an den intrazellulären Ca^{2+} -Signalweg der submukösen Neurone gekoppelt sind.

3. Ergebnisse

Histaminrezeptor-Agonist	Anzahl untersuchter vitaler Neurone n	Anzahl der auf den Agonisten reagierenden Neurone (%)	Δ Fura-2-Ratio der Responder während Peak 1 (Mittelwert \pm SEM)
TMPH	102	66	$0,46 \pm 0,051^*$
Amthamin	96	54	$0,34 \pm 0,028^*$
R-α-Methylhistamin	98	52	$0,41 \pm 0,050^*$

Tabelle 3.3. Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (erfasst als Fura-2-Ratio) isolierter submuköser Neurone in Zellkultur induziert durch H_1 -, H_2 - und H_3 -Agonisten; Konzentration der Agonisten je $100 \mu\text{mol/l}$. Angegeben ist der Prozentsatz der auf den jeweiligen Agonisten reagierenden vitalen Neurone sowie der Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals über die Baseline (Δ Fura-2-Ratio) bei den Respondern. * $p < 0,05$ im Vergleich Peak 1 zur Baseline.

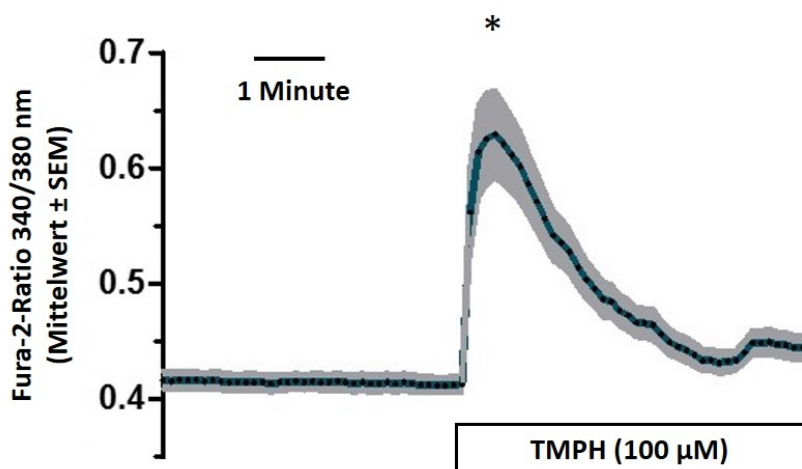


Abbildung 3.11. Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (gemessen als Fura-2-Ratio) isolierter submuköser Neurone in Zellkultur auf den H_1 -Agonisten TMPH ($100 \mu\text{mol/l}$); Die Kurve zeigt den Mittelwert (Linie) \pm SEM (graue Fläche) der Responder ($n=67$). * $p < 0,05$ im Vergleich Peak 1 gegen Baseline. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3. Ergebnisse

3.1.2.4. Funktionelle Identifizierung mittels Antagonisten

Um zu überprüfen, ob die Histaminrezeptor-Subtypen H_1 , H_2 und H_3 tatsächlich an der Reaktion auf natives Histamin beteiligt sind, wurden Ca^{2+} -Imaging-Experimente mit selektiven Histaminrezeptor-Antagonisten durchgeführt. Hierzu wurde nach der initialen Stabilisierungsphase eine zehnminütige Inkubation mit dem entsprechenden Histaminrezeptor-Antagonisten (500 $\mu\text{mol/l}$) durchgeführt, bevor die Applikation von Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) erfolgte. Aufgrund der beobachteten Desensitivierung bei wiederholter Histaminapplikation (siehe 3.1.1.1.) konnten Versuch und Kontrolle nicht an denselben Zellen durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde für jede Versuchsreihe eine eigene Kontrollmessung ohne Zugabe des Antagonisten an Zellen auf separaten Glasplättchen durchgeführt. Eine Übersicht über die verwendeten Substanzen findet sich in Hill et al. 1997 und Stark 2007.

In Gegenwart des H_1 -Antagonisten Pyrilamin reduzierte sich der Anteil der auf Histamin reagierenden Neurone statistisch signifikant von 75 % auf 17 %. Die Neurone, die trotz Blockade des H_1 -Rezeptors eine Antwort auf Histamin zeigten, wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine um etwa ein Drittel verminderte und damit signifikant reduzierte Amplitude der Fura-2-Ratio auf. Eine typische Reaktion eines submukösen Neurons auf Histamin nach Inkubation mit Pyrilamin ist in Abbildung 3.12. B dargestellt. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei Experimenten mit dem H_2 -Rezeptor-Antagonisten Cimetidin. Auch hier waren nach Inkubation mit dem Rezeptorantagonisten sowohl der Anteil der Responder als auch die Größe der Reaktion signifikant reduziert. Eine Blockade der H_3 -Rezeptoren mit dem Antagonisten Thioperamid konnte zwar die Responderquote und auch die Peakhöhe geringgradig reduzieren, die Veränderungen erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sowohl H_1 - als auch H_2 -Rezeptoren an der Antwort auf Histamin beteiligt sind. Histaminrezeptoren vom Subtyp H_3 scheinen dagegen bei der Reaktion nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Ergebnisse der Antagonistenexperimente sind in Abbildung 3.13. sowie Tabelle 3.4. zusammengefasst.

3. Ergebnisse

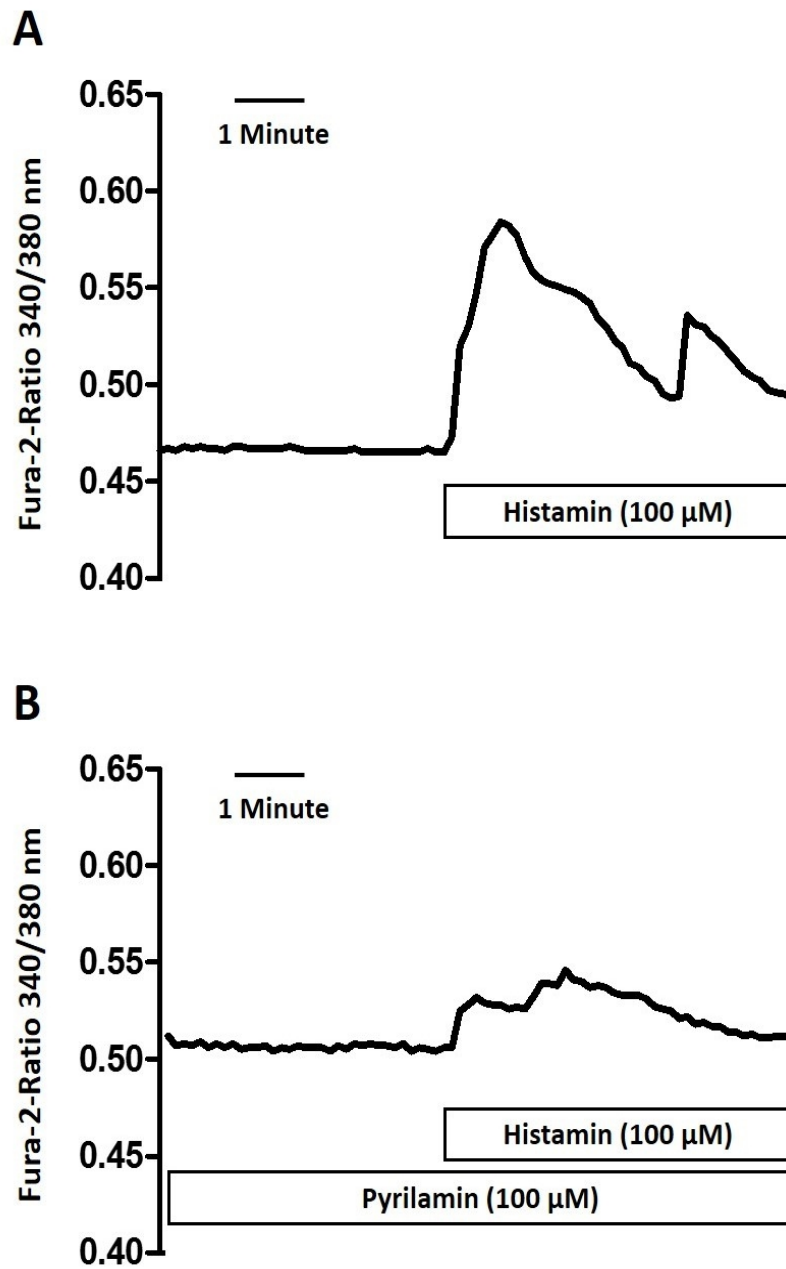


Abbildung 3.12. Repräsentatives Originaltracing der Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (gemessen als Fura-2-Ratio) eines isolierten submukösen Neurons in Zellkultur auf Histamin (100 µmol/l) unter Kontrollbedingungen (A) bzw. nach Inkubation mit dem H_1 -Antagonisten Pyrilamin (500 µmol/l) (B).

3. Ergebnisse

Da beim Einsatz der einzelnen Histaminrezeptor-Antagonisten nie eine komplette Hemmung zu beobachten war, scheint es wahrscheinlich, dass mehrere Rezeptorsubtypen an der Antwort beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde im Anschluss eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der ein Gemisch aller drei der zuvor verwendeten Antagonisten (je 500 $\mu\text{mol/l}$) eingesetzt wurde. Erwartungsgemäß konnten auch hier der Anteil der Responder sowie die Höhe des Peaks signifikant reduziert werden. Allerdings entsprachen die Werte in etwa den Ergebnissen, die auch nach Einsatz des H_1 -Rezeptor-Antagonisten Pyrilamin verzeichnet werden konnten. Das heißt eine vollständige Blockade der Reaktion auf Histamin in submukösen Neuronen war auch mit einer Kombination der Histaminrezeptor-Antagonisten nicht möglich (siehe hierzu auch Abbildung 3.13. sowie Tabelle 3.4.). Möglicherweise waren die (obwohl schon recht hoch gewählten) Inhibitorkonzentrationen nicht ausreichend. Andererseits kann aber auch eine Beteiligung von anderen Rezeptoren (H_4) nicht vollständig ausgeschlossen werden.

	Anzahl untersuchter vitaler Neurone n		Anteil der auf Histamin reagierenden Neurone (%)		Δ Fura-2-Ratio der Responder während Peak 1 (Mittelwert \pm SEM)	
	-	+	-	+	-	+
\pm Pyrilamin	65	65	75	17*	0,41 \pm 0,061	0,26* \pm 0,030
\pm Cimetidin	88	81	58	23*	0,45 \pm 0,039	0,31* \pm 0,042
\pm Thioperamid	62	66	56	42	0,49 \pm 0,074	0,36 \pm 0,052
\pm Blocker-Mix	80	83	67	18*	0,45 \pm 0,052	0,26* \pm 0,035

*Tabelle 3.4. Ergebnisse aus den Versuchen zur Beteiligung der Histaminrezeptoren H_1 , H_2 und H_3 an der Reaktion isolierter submuköser Neurone in Zellkultur auf Histamin. Dargestellt ist die Antwort der Neurone auf Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) der jeweiligen Antagonisten (jeweils 500 $\mu\text{mol/l}$). Angegeben ist der Prozentsatz der auf Histamin reagierenden vitalen Neurone sowie der Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals über die Baseline (Δ Fura-2) bei den Respondern. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Histamin ohne Antagonist.*

3. Ergebnisse

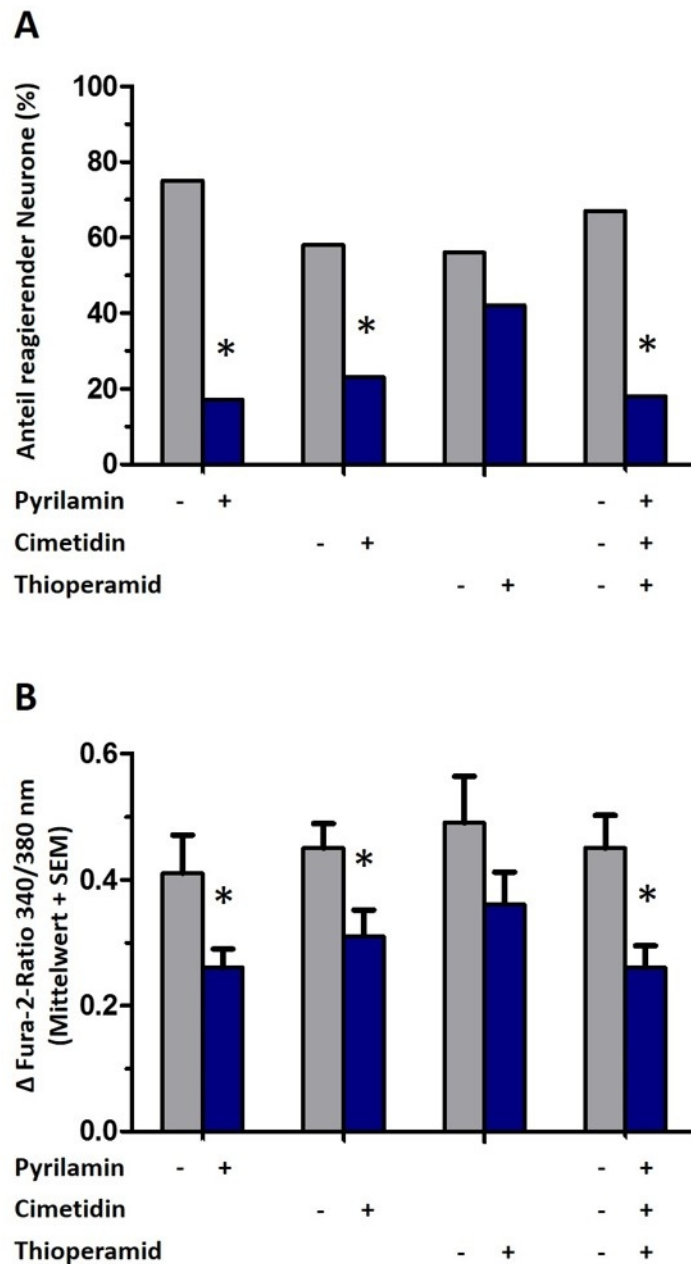


Abbildung 3.13. Veränderung der Ca^{2+} -Antwort isolierter submuköser Neurone in Zellkultur auf Histamin ($100 \mu\text{mol/l}$) nach Inkubation mit Antagonisten gegen die Histaminrezeptoren H_1 , H_2 und H_3 . Die Wirkung von Histamin wurde in Anwesenheit (+) der angegebenen Hemmstoffe getestet und mit der Antwort unter Kontrollbedingungen in Abwesenheit der entsprechenden Blocker (-) verglichen. Konzentration der Antagonisten jeweils $500 \mu\text{mol/l}$; A: Anteil der Responder auf Histamin; B: Anstieg der Fura-2-Ratio bei den Respondern (Mittelwert + SEM); * $p < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung auf Histamin unter Kontrollbedingungen. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3. Ergebnisse

3.1.3. Die Wirkung von Histamin auf Neurone des intakten Plexus submucosus

Nachdem die Charakterisierung primär kultivierter, submuköser Neurone aus dem Kolon der Ratte abgeschlossen war, sollte eine Messung des Membranpotentials an intakten Ganglien des Plexus submucosus erfolgen. Zur Überprüfung der Vitalität dieses Präparates wurden zuerst Ca^{2+} -Imaging-Versuche durchgeführt, um die Histaminantwort der intakten Ganglien mit derjenigen der isolierten, in Zellkultur gehaltenen, Neurone zu vergleichen.

3.1.3.1. Die Reaktion von Neuronen des intakten Plexus submucosus auf Histamin im Ca^{2+} -Imaging

Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) löste einen Anstieg der Fura-2-Ratio an Neuronen intakter submuköser Ganglien aus, welche im Mittel bei $0,52 \pm 0,055$ lag. Der Anteil der Responder, die mindestens einen Peak ausbildeten, lag bei 76 % (29 von 38 untersuchten Neuronen). Ein zweiter Peak konnte bei 49 % der Neurone beobachtet werden. Die Reaktion auf Histamin stellte sich im Ca^{2+} -Imaging vergleichbar zu der in Abbildung 3.3. gezeigten Reaktion eines kultivierten Neurons dar. Die Ergebnisse zeigen, dass Neurone, die sich noch in intakten Ganglien befinden, im Ca^{2+} -Imaging eine Antwort auf Histamin zeigen, die sich nicht von der Reaktion isolierter, primär kultivierter submuköser Neurone auf den gleichen Stimulus unterscheiden lässt.

3.1.3.2. Die Änderung des Membranpotentials durch Histamin in Neuronen des intakten Plexus submucosus

Es wurde bereits beschrieben, dass Histamin eine Depolarisation des Membranpotentials in submukösen Neuronen des Meerschweinchens hervorruft (Frieling et al. 1993). Um zu prüfen, ob dies auch bei der Ratte der Fall ist, habe ich Mikroelektroden-Ableitungen an Neuronen in intakten submukösen Ganglien vorgenommen (siehe 2.12.).

Das Ruhemembranpotential dieser Neurone lag im Mittel bei $-35 \pm 6,5$ mV ($n=6$). Nach einer Stabilisierungsphase wurde Histamin aus einer Stocklösung vorsichtig in die Messkammer pipettiert, sodass in dieser eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ entstand. Unmittelbar nach der Zugabe von Histamin war eine statistisch signifikante Depolarisation der Zellen zu beobachten. Diese erreichte ihren höchsten Wert im Mittel bei $-10 \pm$

3. Ergebnisse

6,2 mV ($p < 0,05$) innerhalb der ersten 30 Sekunden nach Histaminzugabe. Es kam also im Schnitt zu einer Änderung des Membranpotentials um etwa 25 mV. Danach hyperpolarisierte die Membran wieder langsam. Bei zwei der sechs untersuchten Neurone konnte außerdem eine verspätete erneute Depolarisation um 8 bzw. 6 mV beobachtet werden. Abbildung 3.14. zeigt ein Originaltracing der Ableitung des Membranpotentials eines submukösen Neurons, welches neben der initialen Depolarisation auch eine verspätete Depolarisation zeigt.

Submuköse Neurone der Ratte werden also - wie die des Meerschweinchens (Frieling et al. 1993) - durch Histamin erregt.

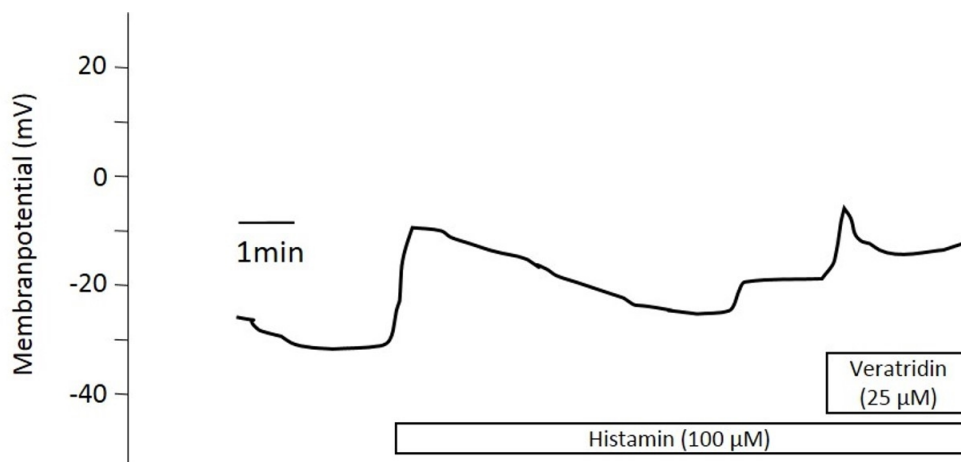


Abbildung 3.14. Repräsentatives Originaltracing der Veränderung des Membranpotentials eines submukösen Neurons in der intakten Submukosa nach Zugabe von Histamin (100 µmol/l) und Veratridin (25 µmol/l) als interne Kontrolle. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3.2. Die Expression des Enzyms Histidindecaboxylase in Neuronen des Plexus submucosus

Das Enzym Histidindecaboxylase (HDC) kann aus der Aminosäure Histidin durch Abspaltung von CO₂ den Mediator Histamin synthetisieren (Iwabuchi et al. 2004). Für Neurone im zentralen Nervensystem wurde bereits beschrieben, dass einige selbst zur Histaminsynthese befähigt sind, diese Neurone werden als histaminerge Neurone bezeichnet (Iwabuchi et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der HDC in Neuronen des Plexus submucosus aus dem Kolon der Ratte untersucht.

3.2.1. Immunzytochemische Doppelmarkierungen

Der erste Nachweis der HDC in submukösen Neuronen aus dem Kolon der Ratte erfolgte durch Erstellung immunzytochemischer Doppelmarkierungen an isolierten, primär kultivierten Neuronen. Als neuronaler Marker wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das neuronenspezifische Protein MAP2 verwendet. In Abbildung 3.15. ist der neuronale Marker in grün dargestellt. Zur Markierung des Enzyms wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der in Abbildung 3.15. in rot dargestellt ist. Im Experiment ist deutlich eine Rotfärbung im Bereich der Neurone zu erkennen. Eine Überlagerung beider Einzelbilder, bei der zusätzlich die Zellkerne mittels DAPI blau dargestellt sind, ist ebenfalls in Abbildung 3.15. zu sehen. Durch die Überlagerung des grünen und roten Signals entsteht zum Teil eine gelbliche Farbe als Zeichen der Co-Lokalisation beider Antigene. Abbildung 3.15. zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig voneinander angefertigten immunzytochemischen Markierungen.

Um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers an die Zielstruktur ausschließen zu können, wurde eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper durchgeführt. Das Ergebnis ist ebenfalls in Abbildung 3.15. dargestellt. Als weitere Kontrollen wurden eine Isotypkontrolle sowie die Inkubation mit einem sogenannten Blockingpeptid durchgeführt (Bilder nicht aufgeführt) (siehe 2.10.3.). Beide Kontrollen fielen negativ aus.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse lassen eine Expression der HDC in submukösen Neuronen aus dem Kolon der Ratte vermuten.

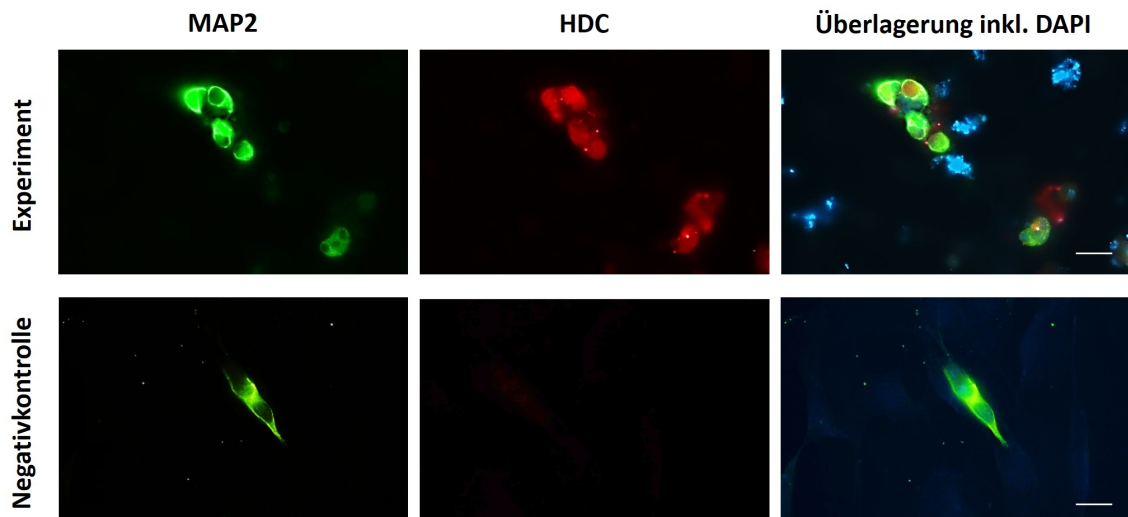


Abbildung 3.15. Immunzytochemische Doppelmarkierung isolierter submuköser Neurone in Zellkultur gegen die Histidindecaboxylase; repräsentative Darstellung eines von drei unabhängig voneinander angefertigten Experimenten; Eichbalken: 20 μm .

3.2.2. RT-PCR

Um das Ergebnis der immunzytochemischen Markierungen zu überprüfen, wurde eine RT mit nachfolgender PCR aus isolierter RNA der Submukosa aus dem Kolon der Ratte durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde isolierte RNA aus der Zelllinie RBL-2H3 verwendet, welche Histamin synthetisiert und somit die HDC exprimiert. Als interne Kontrolle wurden Primer für GAPDH mitgeführt. Als Negativkontrollen wurden Wasserkontrollen sowie die Produkte der Negativkontrollen aus der RT-PCR verwendet (vergleiche 2.11.4.). Es wurden drei Versuche unabhängig voneinander durchgeführt, die alle dasselbe Ergebnis zeigten. Abbildung 3.16. zeigt ein repräsentatives Foto eines Agarosegels, in welchem die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

3. Ergebnisse

Es lassen sich Banden im Bereich der erwarteten Produktgröße von 294 bp sowohl aus dem RBL-2H3-Isolat als auch aus der isolierten Submukosa darstellen. Die interne Kontrolle GAPDH liefert das erwartete Produkt von 303 bp. Das Ergebnis scheint das Ergebnis der immunzytochemischen Markierungen zu bestätigen und belegt die Expression der HDC in der intakten Submukosa auf mRNA-Ebene.

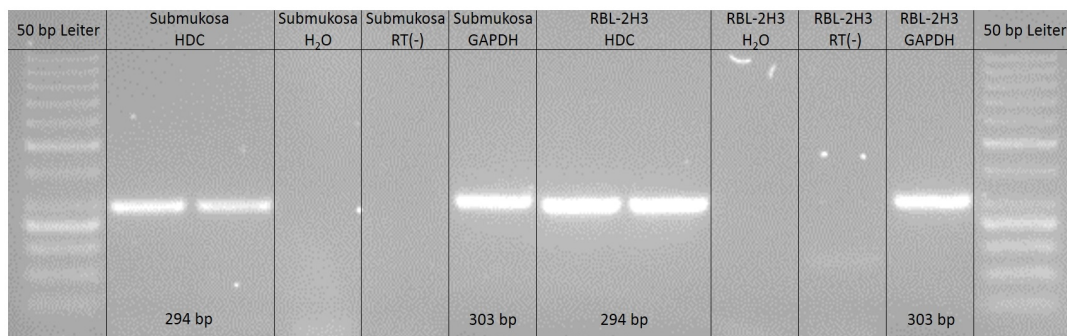


Abbildung 3.16. Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte nach erfolgter PCR aus isolierter RNA der Submukosa unter Verwendung von Primern gegen die Histidindecaboxylase sowie GAPDH; Positivkontrolle: PCR aus isolierter RNA von RBL-2H3-Zellen. Repräsentative Darstellung eines von drei unabhängig voneinander angefertigten Experimenten. RT(-): RNase-freies Wasser anstelle von RNA in der RT und Produkt aus dieser Reaktion in der PCR eingesetzt, H₂O: RNase-freies Wasser anstelle von cDNA in der PCR.

3.3. Die Kommunikation zwischen kultivierten submukösen Neuronen und RBL-2H3-Zellen am Modell der Co-Kultur

Um die Interaktionen zwischen submukösen Neuronen aus dem Kolon der Ratte und Mastzellen genauer untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Co-Kultur-Modell, in welchem beide Zelltypen für einige Tage gemeinsam kultiviert wurden, entwickelt. Der Fokus lag dabei auf der Untersuchung der Wirkung verschiedener nach Mastzelldegranulation freigesetzter Mediatoren. Die Mastzellen wurden dementsprechend in erster Linie als Mediatorspeicher verwendet und selbst nicht detaillierter untersucht. Aus diesem Grund konnte mit der Zelllinie RBL-2H3 anstatt mit frisch isolierten Mastzellen gearbeitet werden. Die Zelllinie RBL-2H3 ist ein Mastzelläquivalent, welches sehr häufig zur Untersuchung von Mastzellen verwendet wird. Es ist beschrieben, dass RBL-2H3-Zellen, analog zu Mastzellen, verschiedene Mediatoren produzieren und durch Degranulation freisetzen (Kulczycki et al. 1974). Die Verwendung einer permanenten Zelllinie hatte den Vorteil, dass diese jederzeit in ausreichender Anzahl und vergleichbarer Qualität zur Verfügung stand.

3.3.1. Die Stimulation submuköser Neurone durch Degranulation von RBL-2H3-Zellen

3.3.1.1. Der Effekt von Compound 48/80 auf RBL-2H3-Zellen

Um untersuchen zu können, ob es durch die Degranulation von RBL-2H3-Zellen, welche mit submukösen Neuronen co-kultiviert wurden, zur Aktivierung dieser Neurone kommt, musste zunächst eine zuverlässige Möglichkeit zur Degranulation der RBL-2H3-Zellen etabliert werden. Der klassische Weg der Degranulation, also der exozytotischen Freisetzung präformierter Mediatoren, verläuft durch Querverbindung spezifischer Antikörper vom Typ IgE durch Antigenbindung, welche sich, nach vorangegangener Sensibilisierung gegen dieses Antigen, auf der Zelloberfläche der Mastzelle bzw. RBL-2H3-Zelle befinden (Kraneveld et al. 2012). Die Exozytose wird durch einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst (Trikha et al. 2010). Es gibt jedoch auch andere Wirkstoffe, die eine Degranulation hervorrufen können, z.B. die von mir verwendete Substanz Compound 48/80 (Kőszegi et al. 2006).

3. Ergebnisse

Zur Etablierung einer sinnvollen Wirkstoffkonzentration wurde in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten an RBL-2H3-Zellen eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erhoben. Die Ca^{2+} -Imaging-Messungen starteten mit einer initialen Stabilisierungsphase, in welcher die Zellen mit Tyrode superfundiert und die Fura-2-Ratio aufgezeichnet wurde. Sobald eine gleichmäßige Baseline der Fura-2-Ratio für mindestens fünf Minuten beobachtet werden konnte, wurde eine Stocklösung von Compound 48/80 in die Messkammer pipetiert. Der Effekt von Compound 48/80 wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ getestet. Die Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ konnte keine Veränderung der Fura-2-Ratio hervorrufen, bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ reagierten lediglich 23 % der Mastzellen (6 von 26 getesteten Zellen) auf Compound 48/80. Bei der Konzentration von Compound 48/80 in der Messkammer 100 $\mu\text{mol/l}$, reagierten alle der 25 untersuchten RBL-2H3-Zellen mit einem deutlichen Anstieg der Fura-2-Ratio, welche im Mittel bei $1,96 \pm 0,270$ lag. Daher wurde Compound 48/80 in den folgenden Experimenten in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt.

3.3.1.2. Der Effekt von Compound 48/80 auf kultivierte submuköse Neurone

Um auszuschließen, dass Compound 48/80 eine direkte Wirkung auf enterische Neurone ausübt, wurde eine weitere Ca^{2+} -Imaging-Versuchsreihe angeschlossen, in welcher der Effekt von Compound 48/80 auf isolierte, primär kultivierte submuköse Neurone untersucht wurde. Nachdem eine stabile Baseline von mindestens fünf Minuten Länge aufgezeichnet wurde, erfolgte die Zugabe von Compound 48/80 (100 $\mu\text{mol/l}$) in die Messkammer. Von 39 untersuchten Nervenzellen reagierte nur eine einzige auf Compound 48/80. Eine Kurve, welche den Mittelwert sowie den Standardfehler der Fura-2-Ratio der untersuchten Neurone zeigt ist in Abbildung 3.17.A dargestellt. Die Tatsache, dass die Applikation von Compound 48/80 zur primären submukösen Zellkultur keine Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration hervorrufen konnte, zeigt, dass es zu keiner direkten Interaktion zwischen submukösen Neuronen und Compound 48/80 kommt.

3. Ergebnisse

Nach Abschluss dieser Vorversuche konnte die Wirkung von Compound 48/80 auf submuköse Neurone, welche mit RBL-2H3-Zellen co-kultiviert wurden (siehe 2.6.3.), überprüft werden. Nach Zugabe von Compound 48/80 (100 $\mu\text{mol/l}$) konnte in 31 von 34 getesteten Neuronen ein statistisch signifikanter Anstieg der Fura-2-Ratio aufgezeichnet werden. Die Amplitude der Fura-2-Ratio erhöhte sich hierbei im Mittel auf $0,74 \pm 0,63$ ($p < 0,05$). Eine Darstellung der Fura-2-Ratio (Mittelwert \pm SEM) der co-kultivierten Neurone zeigt Abbildung 3.17. B. Die Responderquote von co-kultivierten submukösen Neuronen auf Compound 48/80 im Vergleich zur Anzahl reagierender, primär kultivierter, submuköser Neurone ohne RBL-2H3-Zellen ist in Abbildung 3.18. dargestellt.

3. Ergebnisse

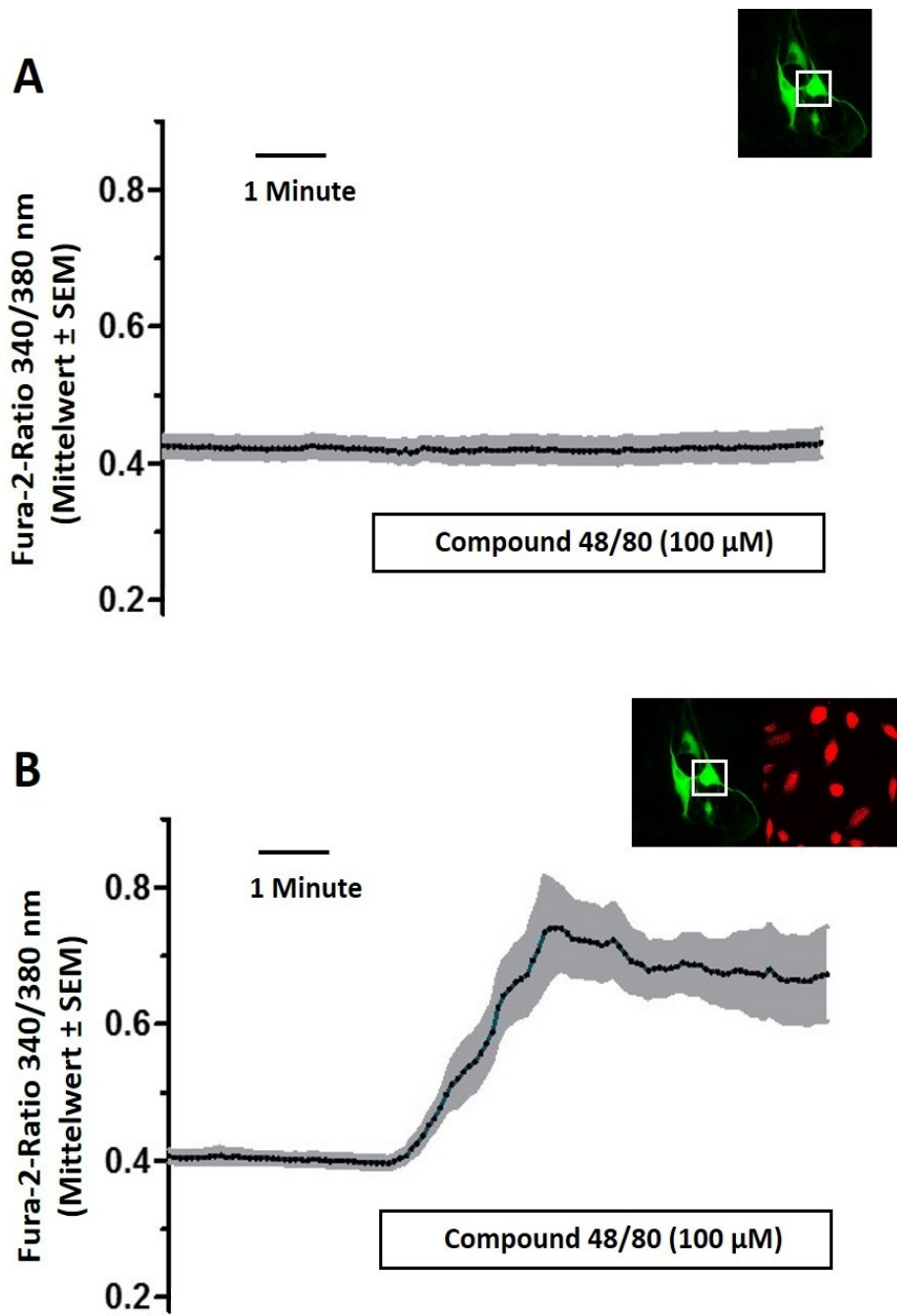


Abbildung 3.17. Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (gemessen als Fura-2-Ratio) isolierter submuköser Neurone in Zellkultur auf Compound 48/80 (100 $\mu\text{mol/l}$). Die Werte der Fura-2-Ratio sind Mittelwerte (Linie) \pm SEM (graues Feld). A: Reaktion isolierter submuköser Neurone ($n=39$); B: Reaktion submuköser Neurone, die mit RBL-2H3-Zellen co-kultiviert wurden ($n=31$). Die Fotos zeigen beispielhaft isolierte Neurone (grün) bzw. RBL-2H3-Zellen (rot) und die Lage eines Messfeldes (ROI, weißes Rechteck). (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3. Ergebnisse

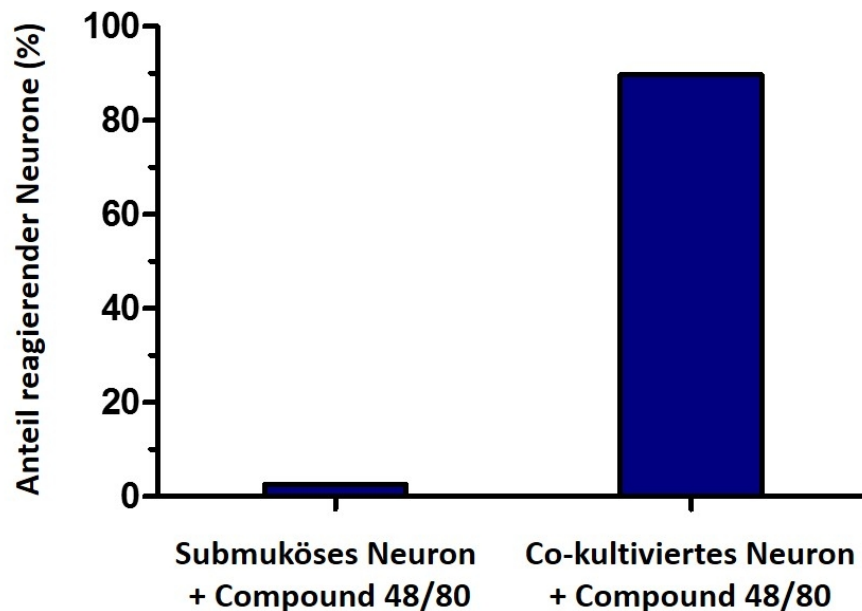


Abbildung 3.18. Vergleich des Anteils der Responder von isolierten, kultivierten submukösen Neuronen ($n=39$) zu submukösen Neuronen, die mit RBL-2H3-Zellen co-kultiviert wurden ($n=34$), auf die Zugabe von Compound 48/80 ($100\text{ }\mu\text{mol/l}$) in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten.

Um den zeitlichen Verlauf der Reaktionen beider Zelltypen untersuchen zu können, wurden bei einigen Ca^{2+} -Imaging-Versuchen mit dem Modell der Co-Kultur nicht nur die co-kultivierten submukösen Neurone, sondern auch einige RBL-2H3-Zellen als ROIs, das bedeutet als Regionen, in welchen die Fluoreszenz gemessen wird, markiert. Bei der Analyse dieser Messungen konnte gezeigt werden, dass es durch die Zugabe von Compound 48/80 ($100\text{ }\mu\text{mol/l}$) zunächst unmittelbar zu einem Anstieg der Fura-2-Ratio in den RBL-2H3-Zellen kommt. Erst zeitlich um etwa 30 Sekunden verzögert setzt die Reaktion in den co-kultivierten submukösen Neuronen ein. Dieser zeitliche Zusammenhang ist am Beispiel von zwei Zellen in Abbildung 3.19. zu sehen.

3. Ergebnisse

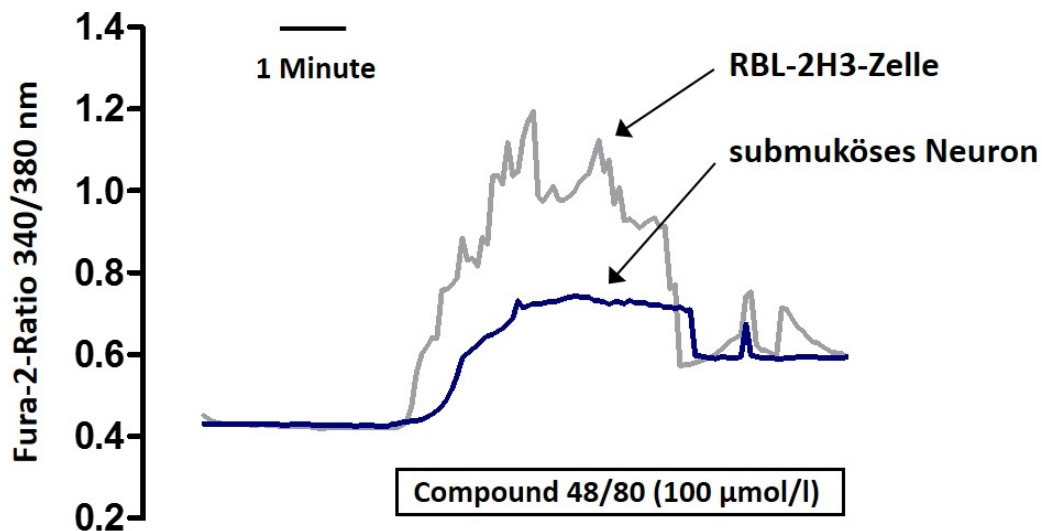


Abbildung 3.19. Repräsentatives Originaltracing des zeitlichen Verlaufs der Reaktion einer RBL-2H3-Zelle und eines co-kultivierten submukösen Neurons auf die Zugabe von Compound 48/80 (100 µmol/l) in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

Dieser Zeitverlauf passt zu der Annahme, dass die submukösen Neurone durch Mediatoren, die bei der Degranulation der Mastzellen freigesetzt werden, stimuliert werden.

3.3.2. Untersuchung beteiligter Mastzellmediatoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es durch die Freisetzung von Mastzellmediatoren aus RBL-2H3-Zellen durch Compound 48/80 (100 µmol/l) zu einer starken Stimulation co-kultivierter submuköser Neurone kommt, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, welche Mastzellmediatoren an der Aktivierung der Neurone beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden Ca^{2+} -Imaging-Experimente durchgeführt, bei denen die Co-Kulturen für 15 Minuten mit Hemmstoffen vorbehandelt wurden. Die Wirkung von Compound 48/80 wurde mit parallel durchgeführten Messungen an unbehandelten Kontrollkulturen verglichen.

3. Ergebnisse

3.3.2.1. Die Beteiligung von Histamin

Um den Anteil von Histamin, dem zentralen allergischen Mastzellmediator (Berin und Sampson 2013), an der durch Compound 48/80 vermittelten Reaktion der co-kultivierten Neurone zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen Antagonisten gegen die Histaminrezeptor-Subtypen H_1 , H_2 und H_3 eingesetzt wurden. Es wurde mit den gleichen Antagonisten gearbeitet, die schon bei den Experimenten zur Identifizierung der Rezeptorbeteiligung an der Reaktion von Histamin auf isolierte, primär kultivierte Neurone aus dem Kolon der Ratte verwendet wurden (siehe 3.1.2.4.). Bei den Experimenten mit der Co-Kultur wurden die Antagonisten jedoch in einer geringeren Konzentration (100 $\mu\text{mol/l}$) eingesetzt. Dieser Änderung lag die Vermutung zugrunde, dass die Histaminkonzentration in der Messkammer, die durch Freisetzung von Mastzellmediatoren erreicht werden konnte, deutlich geringer ausfallen würde als 100 $\mu\text{mol/l}$, welches der Konzentration entspricht, die bei den unter 3.1.2.4. beschriebenen Experimenten eingesetzt wurde.

In Gegenwart des H_1 -Rezeptor-Antagonisten Pyloramin (100 $\mu\text{mol/l}$) war der Effekt von Compound 48/80 in der Co-Kultur stark vermindert. Während unter Kontrollbedingungen 89 % (39 von 44 Zellen) der untersuchten Neurone auf Compound 48/80 (100 $\mu\text{mol/l}$) reagierten, betrug der Anteil der Responder nach Inkubation mit Pyloramin nur noch 10 % (4 von 40 Zellen, $p < 0,05$). Die Amplitude des Anstiegs der Fura-2-Ratio wurde durch Vorbehandlung mit Pyloramin ebenfalls statistisch signifikant reduziert. Die Kontrollgruppe zeigte eine Reaktion mit einem Mittelwert von $0,89 \pm 0,118$, während die verbliebenen Responder nach Inkubation mit Pyloramin auch nur eine geringe Peakhöhe mit einem Mittelwert von $0,21 \pm 0,081$ zeigten.

Die Inkubation mit dem H_2 -Rezeptor-Antagonisten Cimetidin (100 $\mu\text{mol/l}$) konnte die Anzahl der Responder auf Compound 48/80 im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar nicht reduzieren (auch nach Inkubation mit Cimetidin reagierten 38 von 42 Zellen auf Compound 48/80), jedoch wurde die Amplitude der Fura-2-Ratio statistisch signifikant auf einen Mittelwert von $0,68 \pm 0,102$ im Gegensatz zur Kontrollgruppe, deren Peakhöhe im Schnitt bei $0,98 \pm 0,176$ lag, vermindert.

Die Vorbehandlung mit dem H_3 -Rezeptor-Antagonisten Thioperamid (100 $\mu\text{mol/l}$) konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe weder den Anteil der auf Compound 48/80 rea-

3. Ergebnisse

gierenden Neurone noch die Amplitude der gemessenen Fura-2-Ratio senken. In der Kontrollgruppe lag der Anteil der Responder auf Compound 48/80 bei 61 % (27 von 44 Zellen), die Fura-2-Ratio zeigte einen mittleren Anstieg von $0,29 \pm 0,040$. Die Versuchsgruppe zeigte eine Responderquote von 47 % (23 von 49 Zellen) mit einer Fura-2-Ratio, die nach Zugabe von Compound 48/80 im Mittel um $0,39 \pm 0,112$ anstieg.

In einer letzten Versuchsreihe zur Untersuchung der Beteiligung der verschiedenen Histaminrezeptoren an der Antwort co-kultivierter Neurone auf Compound 48/80 wurden alle drei zuvor verwendeten Histaminrezeptor-Antagonisten in einem Gemisch (Konzentration jeweils 100 $\mu\text{mol/l}$) angewendet. Erwartungsgemäß konnten durch die Inkubation mit dem Antagonisten-Gemisch sowohl die Responderquote statistisch signifikant von 99 % (72 von 73 Zellen) auf 12 % (9 von 74 Zellen) gesenkt werden als auch die Peakhöhe der Fura-2-Ratio statistisch signifikant von einem Mittelwert von $0,55 \pm 0,037$ auf einen Mittelwert von $0,12 \pm 0,006$ reduziert werden. Die Ergebnisse entsprechen jedoch denen, die auch bei Inkubation mit dem H_1 -Rezeptor-Antagonisten Pyrilarmin allein erzielt wurden.

Die Resultate (zusammengefasst in Abbildung 3.20.) lassen eine zentrale Beteiligung von Histamin an der Reaktion der co-kultivierten submukösen Neurone auf Compound 48/80 vermuten. Dabei scheinen sowohl H_1 - als auch (wenn auch in einem geringeren Maße) H_2 -Rezeptoren an der Reaktion beteiligt zu sein, während H_3 -Rezeptoren offenbar keine Rolle spielen.

3. Ergebnisse

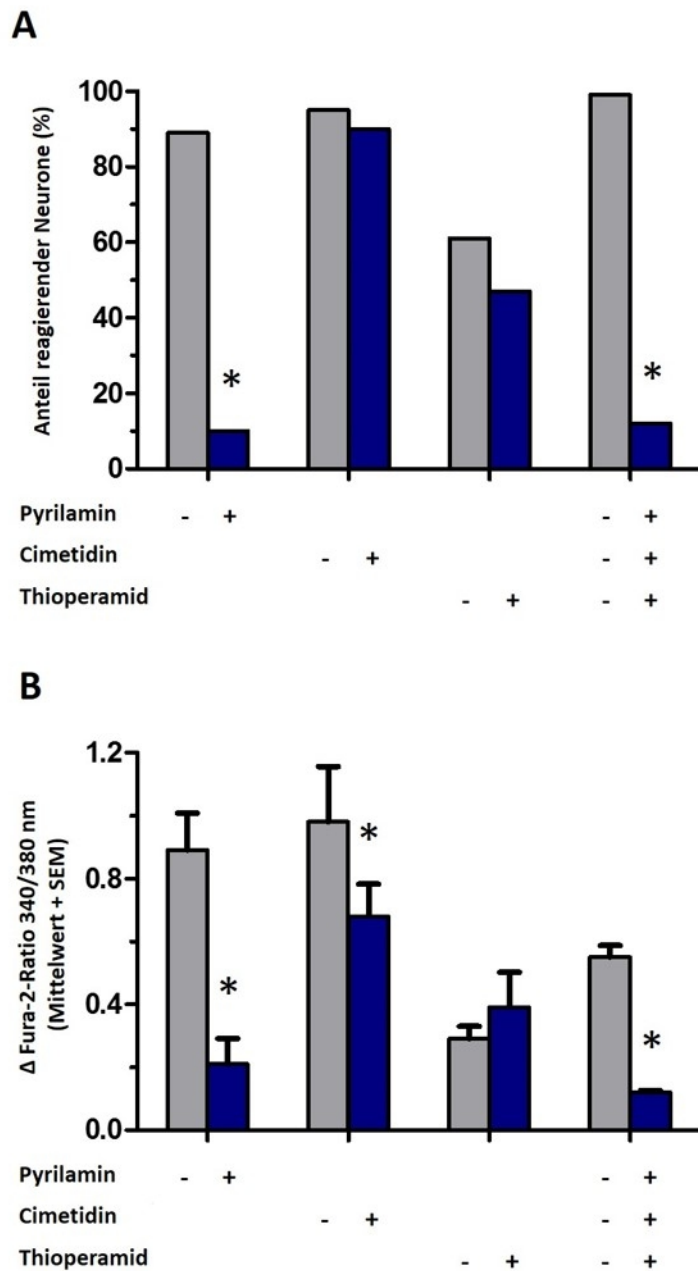


Abbildung 3.20. Veränderung der Ca^{2+} -Antwort co-kultivierter submuköser Neurone auf die Zugabe von Compound 48/80 ($100 \mu\text{mol/l}$) durch die Vorbehandlung mit Antagonisten gegen die Histaminrezeptoren H_1 , H_2 und H_3 . Die Antwort auf den Mastzelldegranulator wurde in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) der jeweiligen Inhibitoren gemessen; Konzentration der Antagonisten je $100 \mu\text{mol/l}$; $n=40-74$. A: Anteil der Responder; B: Anstieg der Fura-2-Ratio bei den Respondern (Mittelwert + SEM). * $p < 0,05$ im Vergleich zur Antwort unter Kontrollbedingungen. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3. Ergebnisse

3.3.2.2. Die Beteiligung von Eicosanoiden

Die Degranulation von Mastzellen führt nicht nur zur Freisetzung präformierter und in Vesikeln gespeicherter Mediatoren, sondern initiiert ebenso die De-novo-Synthese von verschiedenen Mediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen (Kraneveld et al. 2012). Um herauszufinden, ob neben präformierten Mediatoren wie Histamin auch neu gebildete Prostaglandine und Leukotriene auf die co-kultivierten Neurone wirken, wurden Ca^{2+} -Imaging-Experimente mit Blockern der synthetisierenden Enzyme beider Stoffgruppen durchgeführt. Indometacin hemmt das Enzym Cyclooxygenase (= COX), welches für die Prostaglandinsynthese verantwortlich ist (Kato et al. 2001). Zur Blockade der 5-Lipoxygenase (= LOX), des Enzyms zur Synthese von Leukotrienen, wurde BW A4C verwendet (Tateson et al. 1988).

Indometacin (1 $\mu\text{mol/l}$) beeinflusste weder die Responderquote noch die Höhe der Amplitude der Fura-2-Ratio. Während in der Versuchsgruppe 76 % (39 von 51 Zellen) der untersuchten co-kultivierten Neurone mit einer durchschnittlichen Peakhöhe von $0,55 \pm 0,068$ auf Compound 48/80 reagierten, waren es in der Kontrollgruppe 85 % (40 von 47 Zellen) mit einem vergleichbaren Mittelwert in der Peakhöhe von $0,68 \pm 0,070$.

Im Gegensatz dazu reduzierte die Blockade der 5-Lipoxygenase mit BW A4C (10 $\mu\text{mol/l}$) den Anteil der reagierenden co-kultivierten Neurone auf Compound 48/80 von 94 % (47 von 50 Zellen) in der Kontrollgruppe auf 46 % (26 von 56 Zellen) in der Versuchsgruppe. Dieser Unterschied in der Responderquote war statistisch signifikant ($p < 0,05$). Auch die Größe des erreichten Peaks in der Fura-2-Ratio nach Zugabe von Compound 48/80 wurde statistisch signifikant reduziert. Während sie in der Kontrollgruppe noch einen Mittelwert von $1,25 \pm 0,076$ aufwies, betrug sie nach Inkubation mit BW A4C nur noch $0,54 \pm 0,069$.

Abbildung 3.21. zeigt die eben beschriebenen Ergebnisse zu den Versuchen bezüglich der Beteiligung von Prostaglandinen und Leukotrienen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Prostaglandine bei der Vermittlung der Aktivierung co-kultivierter Neurone durch Compound 48/80 keine Rolle spielen, Leukotriene hingegen schon.

3. Ergebnisse

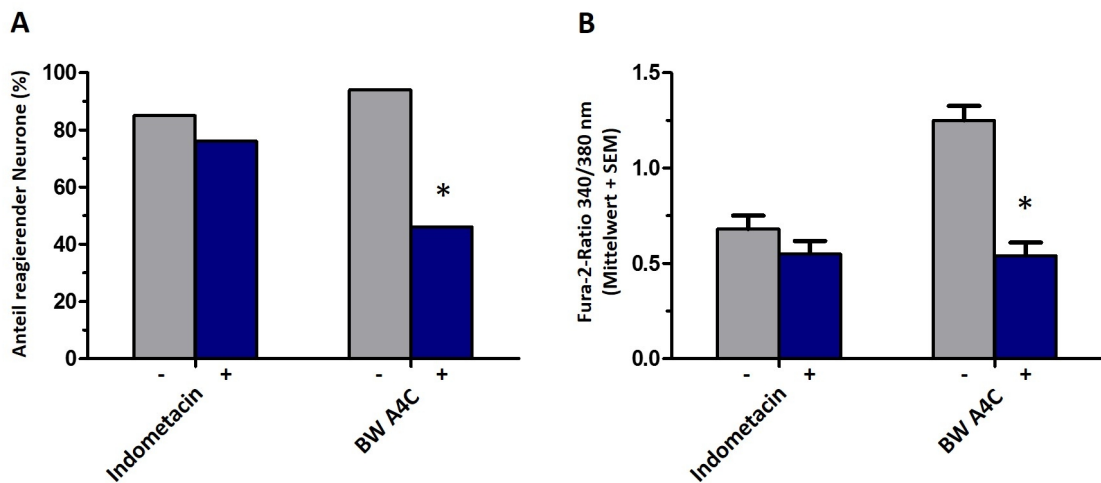


Abbildung 3.21. Veränderung der Ca^{2+} -Antwort co-kultivierter submuköser Neurone auf die Zugabe von Compound 48/80 (100 $\mu\text{mol/l}$) durch die Inkubation mit dem COX-Blocker Indometacin (1 $\mu\text{mol/l}$) und dem LOX-Blocker BW A4C (10 $\mu\text{mol/l}$); $n=47-56$. A: Anteil der Responder; B: Anstieg der Fura-2-Ratio bei den Respondern (Mittelwert + SEM). * $p < 0,05$ im Vergleich zur Antwort unter Kontrollbedingungen.

3.3.2.3. Die Beteiligung von Mastzellproteasen

Eine weitere wichtige Gruppe von Mastzellmediatoren stellen die Mastzellproteasen dar. Hierbei handelt es sich um Enzyme, die an einer eigenen Gruppe von Rezeptoren ansetzen, den sogenannten proteaseaktivierten Rezeptoren (protease-activated receptors = PAR). Es sind die Subtypen PAR_1 - PAR_4 dieser Rezeptoren beschrieben (Wang et al. 2002). Da Befunde aus der Literatur (Ikehara et al. 2010) auf eine zentrale Rolle von PAR_1 - und PAR_2 -Rezeptoren im Magen-Darm-Trakt hindeuten, wurden in dieser Arbeit Antagonisten gegen diese beiden Rezeptorsubtypen verwendet.

Da noch keine Daten zur Expression der Rezeptorsubtypen PAR_1 und PAR_2 in submukösen Neuronen der Ratte publiziert sind, wurden zunächst Vorversuche an einer Zellkultur aus isolierten, primär kultivierten submukösen Neuronen ohne Beteiligung von RBL-2H3 -Zellen durchgeführt. Um diese Rezeptorsubtypen funktionell nachzuweisen wurden Thrombin (10 U/ml) und Trypsin (10 $\mu\text{mol/l}$) als PAR_1 - bzw. PAR_2 -Rezeptor-Agonisten verwendet. Sowohl der PAR_1 -Agonist Thrombin als auch der PAR_2 -Agonist Trypsin induzierten einen statistisch signifikanten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in submukösen Neuronen (siehe Tabelle 3.5.).

3. Ergebnisse

PAR-Rezeptor-Agonist	Anzahl untersuchter vitaler Neurone n	Anzahl reagierender Neurone (%)	Anstieg der Fura-2-Ratio bei den Respondern = Δ Fura-2-Ratio (Mittelwert \pm SEM)
Thrombin (10 U/ml)	41	85	0,35* \pm 0,034
Trypsin (10 μ mol/l)	39	89	0,41* \pm 0,051

*Tabelle 3.5. Ergebnisse der Versuche zur Reaktion submuköser Neurone auf den PAR₁-Agonisten Thrombin und den PAR₂-Agonisten Trypsin. Angegeben ist der Prozentsatz der auf den jeweiligen PAR-Agonisten reagierenden vitalen Neurone sowie der mittlere Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals (Δ Fura-2-Ratio) bei den Respondern. * $p < 0,05$ im Vergleich Peak gegen Baseline.*

In der Co-Kultur von submukösen Neuronen und RBL-2H3-Zellen wurde der PAR₁-Rezeptor-Antagonist FR 171113 (Kato et al. 1999) in einer Konzentration von 25 μ mol/l eingesetzt. Nach Inkubation mit FR 171113 betrug der Anteil der auf Compound 48/80 (100 μ mol/l) reagierenden Neurone 94 % (50 von 53 Zellen), unter Kontrollbedingungen lag die Responderquote bei 97 % (63 von 65 Zellen). Es konnte also kein Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. Die Amplitude der Fura-2-Ratio hingegen lag unter Kontrollbedingungen im Mittel bei $1,38 \pm 0,126$, während nach Blockade der PAR₁-Rezeptoren nur noch eine Peakhöhe von durchschnittlich $0,79 \pm 0,087$ erreicht wurde. Die Größe der Reaktion wurde also durch Einsatz des PAR₁-Rezeptor-Antagonisten statistisch signifikant reduziert.

Vorbehandlung mit dem PAR₂-Rezeptor-Antagonisten GB 83 (20 μ mol/l) (Barry et al. 2010) senkte den Anteil der auf die Zugabe von Compound 48/80 reagierenden co-kultierten Neurone von 91 % (48 von 53 Zellen) in der Kontrollgruppe statistisch signifikant auf 41 % (24 von 58 Zellen). Ebenso reduzierte sich nach der Inkubation mit diesem Blocker die durchschnittliche Peakhöhe von $1,00 \pm 0,059$ unter Kontrollbedingungen statistisch signifikant auf durchschnittlich $0,43 \pm 0,044$ nach PAR₂-Blockade.

Abbildung 3.22. fasst die Befunde zur Beteiligung der Rezeptorsubtypen PAR₁ und PAR₂ zusammen. Die Ergebnisse der Ca²⁺-Imaging-Experimente mit den PAR-Rezeptor-Antagonisten FR 171113 und GB 83 lassen auf eine Beteiligung der Rezeptorsubtypen PAR₁ und PAR₂ an der durch Compound 48/80 vermittelten Aktivierung der co-kultierten submukösen Neurone schließen. Dem PAR₂-Rezeptor scheint hier allerdings eine deutlich größere Rolle zuzufallen.

3. Ergebnisse

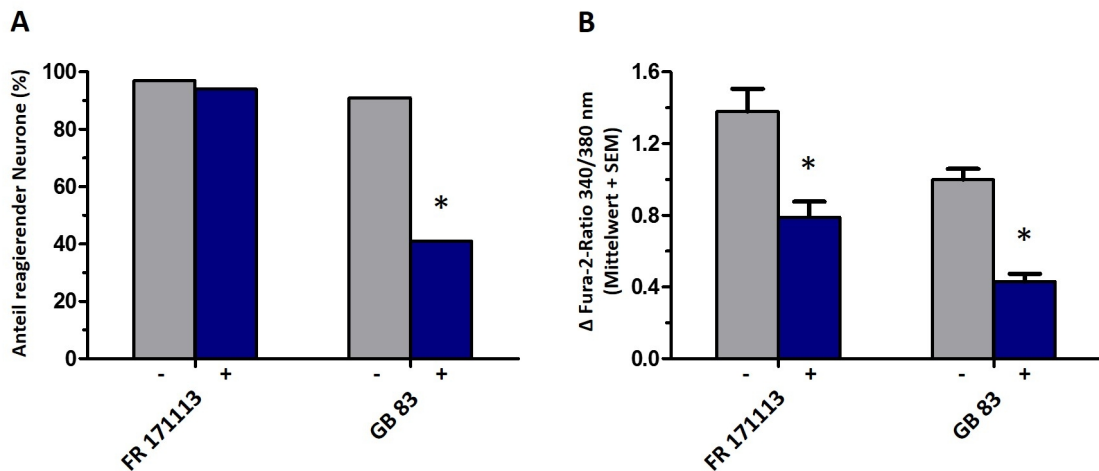


Abbildung 3.22. Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (gemessen als Fura-2-Ratio) co-kultivierter submuköser Neurone auf die Zugabe von Compound 48/80 (100 $\mu\text{mol/l}$) in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von Antagonisten gegen die Proteaserezeptoren PAR_1 (FR 171113, 25 $\mu\text{mol/l}$) und PAR_2 (GB 83, 20 $\mu\text{mol/l}$); $n=53-65$. A: Anteil der Responder; B: Anstieg der Fura-2-Ratio bei den Respondern (Mittelwert + SEM). * $p < 0,05$ im Vergleich zur Reaktion auf Compound 48/80 unter Kontrollbedingungen, also in Abwesenheit des jeweiligen PAR-Antagonisten.

3.3.3. Untersuchung der möglichen Aktivierung von RBL-2H3-Zellen durch Stimulation submuköser Neurone

Nachdem anhand des Modells der Co-Kultur nachgewiesen werden konnte, dass es durch die Degranulation von RBL-2H3-Zellen mittels Compound 48/80 zur Aktivierung co-kultivierter Neurone aus dem Plexus submucosus der Ratte kommt, sollte überprüft werden, ob auch eine Stimulation in die andere Richtung, das heißt von Neuron zu RBL-2H3-Zelle, stattfindet. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden ebenfalls Ca^{2+} -Imaging-Experimente mit dem Modell der Co-Kultur durchgeführt. In diesem Fall wurde jedoch die Fura-2-Ratio der RBL-2H3-Zellen gemessen. Nach einer Stabilisierungsphase, in der eine mindestens fünfminütige stabile Baseline aufgezeichnet werden konnte, wurde die KCl-Konzentration in der Superfusionslösung auf 35 mmol/l erhöht um die co-kultivierten submukösen Neurone durch Depolarisation zu aktivieren. Nun wurde beobachtet, ob sich eine Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den

3. Ergebnisse

RBL-2H3-Zellen als Reaktion auf die Aktivierung der submukösen Neurone ergab. Wie in Abbildung 3.23. dargestellt, konnte eine solche Reaktion auf die neuronale Stimulation in den durchgeführten Experimenten jedoch nicht nachgewiesen werden.

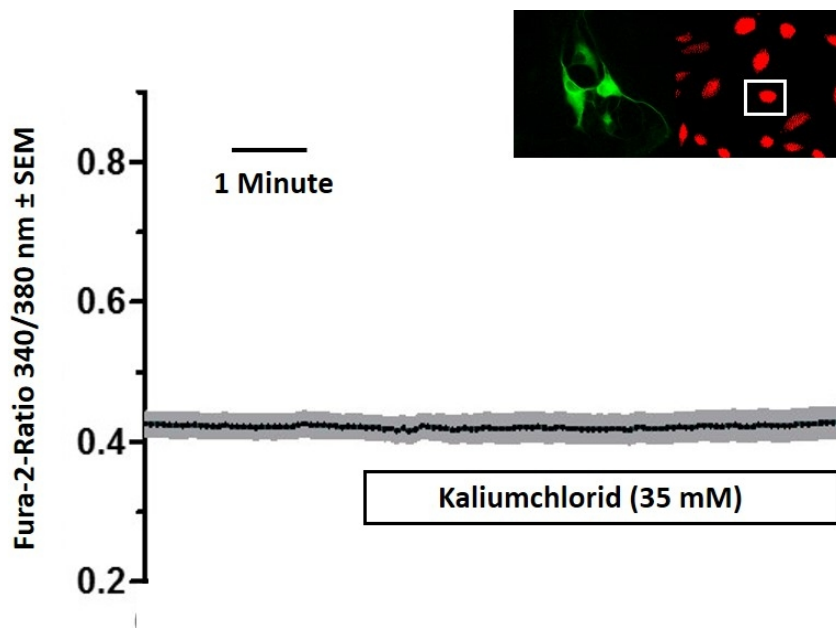


Abbildung 3.23. Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (gemessen als Fura-2-Ratio) von RBL-2H3-Zellen, die mit submukösen Neuronen co-kultiviert wurden, auf neuronale Stimulation mittels Kaliumchlorid (35 mmol/l); Mittelwert (Linie) \pm SEM (graue Fläche); $n = 39$. Die Fotos zeigen beispielhaft isolierte Neurone (grün) bzw. RBL-2H3-Zellen (rot) und die Lage eines Messfeldes (ROI, weißes Rechteck).

3.4. Untersuchung der Antigenwirkung auf epithelialen Transport und parazelluläre Permeabilität an sensibilisierten Tieren

Im letzten Teil meiner Arbeit wurde ein Tierversuch durchgeführt, bei dem Ratten durch zweimalige subkutane Injektion von Ovalbumin gegen diese Substanz sensibilisiert wurden. Hierbei wurde ein modifiziertes Sensibilisierungsprotokoll (siehe 2.8.) angewendet, basierend auf einem in der Literatur beschriebenen Modell (Hug et al. 1996). In Ussingkammer-Versuchen wurde die Reaktion von Submukosa-Mukosa-Präparaten des distalen Kolons sowie Segmenten des Jejunums der sensibilisierten Ratten auf die Zugabe des Antigens, Ovalbumin (100 µg/ml), untersucht. In der Literatur ist die Veränderung des Kurzschlussstroms (I_{sc}) als Reaktion auf Ovalbumin bereits beschrieben worden. Es kommt zu einem Anstieg des I_{sc} , welcher eine Sekretion von Chloridionen darstellt (Hug et al. 1996). Es sollte mit meinen Experimenten zum einen herausgefunden werden, welche Mastzellmediatoren an der Vermittlung der beobachteten Reaktion auf Ovalbumin beteiligt sind. Zum anderen wurde die mögliche Änderung der parazellulären Permeabilität - und damit eine Änderung der Durchlässigkeit der Tight Junctions - nach Zugabe von Ovalbumin untersucht. In diesem Teil meiner Arbeit wurden nicht nur Daten vom Kolon der Ratten erhoben, sondern auch Jejunumsegmente verwendet. Zunächst war es, gerade im Hinblick auf die Fragestellung nach einer möglichen Beeinflussung der parazellulären Permeabilität durch Zugabe von Antigen, interessant, zwei verschieden dichte Epithelien zu untersuchen. Das Epithel im Jejunum gehört zu den leicht durchlässigen („leaky“) Epithelien, während das Kolonepithel zu den mitteldichten („moderately tight“) Epithelien zählt (Markov et al. 2010). Des Weiteren sollten die sensibilisierten Tiere im Sinne des Tierschutzes bestmöglich genutzt werden, sodass die Datenerhebung auf den Darmabschnitt Jejunum, welcher zuvor nicht verwendet wurde, ausgeweitet wurde.

3. Ergebnisse

Eine Vitalitätskontrolle wurde am Ende jedes Versuchs durchgeführt, um den Erhalt der Funktionalität der Gewebepreparate zu überprüfen (siehe 2.13.3.). Dazu wurde Carbachol (50 $\mu\text{mol/l}$) in die Messkammer pipettiert. Carbachol, ein stabiles Acetylcholin-Derivat, ist eine sekretionsfördernde Substanz und führt zu einer Chloridsekretion, welche sich in einem starken Anstieg des I_{sc} darstellt (Strabel und Diener 1995). Eine Auswertung der Ergebnisse erfolgte nur von den Geweben, die eine positive Vitalitätskontrolle aufwiesen.

3.4.1. Antigeninduzierte Veränderungen des Kurzschlussstroms und der parazellulären Fluxes am Kolon

Da der Großteil dieser Arbeit mit Gewebe bzw. Zellen aus dem Kolon von Ratten angefertigt wurde, wird hier zunächst auf die Daten eingegangen, welche am Kolon der sensibilisierten Tiere erhoben wurden. Hierzu wurden Ussingkammer-Messungen an Submukosa-Mukosa-Präparaten (siehe 2.5.1.) aus dem distalen Kolon der gegen Ovalbumin sensibilisierten Tiere durchgeführt.

3.4.1.1. Änderung des Kurzschlussstroms

Abbildung 3.24. zeigt die Änderung des Kurzschlussstroms als Antwort auf die Zugabe von Ovalbumin (100 $\mu\text{g/ml}$) in Ussingkammer-Messungen von Submukosa-Mukosa-Präparaten des distalen Kolons der gegen Ovalbumin sensibilisierten Tiere. Der Kurzschlussstrom (I_{sc}) steigt nach Antigenzugabe sprunghaft an. Im Mittel nahm der I_{sc} um $2,27 \pm 2,78 \mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ($n=8$, $p<0,05$) über die Baseline zu. An Kolonpräparaten von nicht sensibilisierten Kontrolltieren war Ovalbumin (100 $\mu\text{g/ml}$) hingegen wirkungslos. Hier lag das Maximum des I_{sc} -Anstiegs nach Applikation von Ovalbumin im Mittel bei $0,10 \pm 0,029 \mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ($n=8$) und unterschied sich damit nicht von der Baseline.

3. Ergebnisse

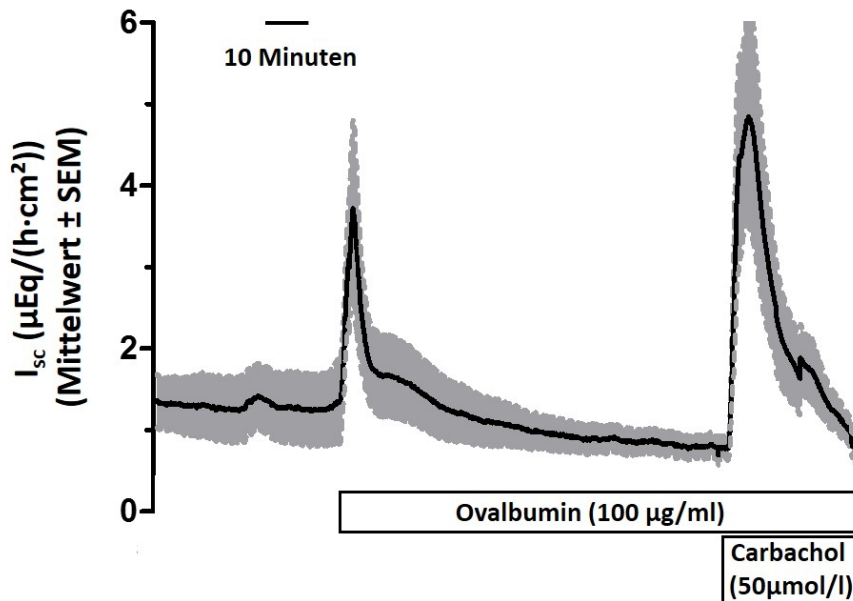


Abbildung 3.24. Antigeninduzierter Anstieg des Kurzschlussstroms an Submukosa-Mukosa-Präparaten aus dem distalen Kolon gegen Ovalbumin sensibilisierter Ratten auf die Zugabe von Ovalbumin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sowie Carbachol (50 $\mu\text{mol}/\text{l}$). Dargestellt ist der Kurzschlussstrom (I_{sc}) als Mittelwert (Linie) \pm SEM (graue Fläche); $n=8$. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3.4.1.2. Beteiligung verschiedener Mastzellmediatoren

Um die Beteiligung verschiedener Mastzellmediatoren an der Antwort auf die Zugabe von Ovalbumin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zu untersuchen, wurden Ussingkammer-Experimente durchgeführt, bei denen vor der Zugabe von Ovalbumin für 10 Minuten mit einem entsprechenden Blocker inkubiert wurde. Um die Tierzahl im Versuch aus Tierschutzgründen möglichst gering zu halten, wurden nur Inhibitoren getestet, die in der Co-Kultur eine Wirksamkeit zeigen konnten. Aus diesem Grund wurden Thioperamid als H_3 -Rezeptor-Antagonist und Indometacin als Blocker der Cyclooxygenase in dieser Versuchsserie nicht verwendet. Alle weiteren Hemmstoffe, die in 3.3.2. aufgeführt sind, wurden in den Ussingkammer-Messungen der sensibilisierten Tiere verwendet.

Jedem sensibilisierten Tier wurden zwei Teile des distalen Kolons entnommen und in je eine Ussingkammer eingespannt. Eine Kammer wurde vor der Zugabe von Ovalbumin mit dem jeweiligen Blocker inkubiert, während der anderen Kammer (als Kontrolle)

3. Ergebnisse

ausschließlich Ovalbumin appliziert wurde. So entstanden zwei gleich große Gruppen, welche im Folgenden als Versuchsgruppe (Ovalbuminzugabe nach zehnminütiger Inkubation mit entsprechendem Blocker) und Kontrollgruppe (Ovalbuminzugabe ohne vorherige Inkubation mit einem Blocker) bezeichnet werden.

Da die Reaktionen der Kontrollgruppen auf Ovalbumin sehr einheitlich verliefen, wurden die Kontrollgruppen aller Blockerexperimente zu einer gemeinsamen Kontrollgruppe gepoolt. Die Anzahl der Messungen in der gepoolten Kontrolle entspricht also der Summe der Anzahl der Messungen in den einzelnen Versuchsgruppen.

Der Anstieg des I_{sc} nach Zugabe von Ovalbumin (100 $\mu\text{g/ml}$) in der gepoolten Kontrollgruppe zeigte einen Peak, der im Mittel um $2,59 \pm 0,36 \mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ($n=39$) über die Baseline anstieg. Die zehnminütige Vorinkubation mit dem H_1 -Rezeptor-Antagonisten Pyrilamin (100 $\mu\text{mol/l}$) führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Peakhöhe auf die Zugabe von Ovalbumin um etwa 75 %. Die Inkubation mit Pyrilamin konnte den Mittelwert des Peaks auf einen Wert von $0,61 \pm 0,20 \mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ($n=8$, $p<0,05$) über die Baseline senken. Die Inkubation mit dem H_2 -Rezeptor-Antagonisten Cimetidin (100 $\mu\text{mol/l}$) führte ebenfalls zu einer Reduktion in der Größe der Reaktion auf Ovalbumin. Der Mittelwert konnte um etwa 20 % auf $2,10 \pm 0,63 \mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ($n=7$) über die Baseline gesenkt werden, die Verminderung der Peakhöhe erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die Blockade der 5-Lipoxygenase mit BW A4C (10 $\mu\text{mol/l}$) reduzierte den ovalbumininduzierten Anstieg des I_{sc} um fast 50 %, der Mittelwert des Maximums der Antwort lag in dieser Versuchsgruppe bei $1,34 \pm 0,40 \mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ($n=8$) über der Baseline. Auch die Antagonisierung der Proteaserezeptoren der Subtypen PAR_1 und PAR_2 mit FR 171113 (25 $\mu\text{mol/l}$) bzw. GB 83 (20 $\mu\text{mol/l}$) verminderte den durch Antigenkontakt induzierten Anstieg des I_{sc} um etwa 40 % bzw. 60 %, auf Mittelwerte von $1,49 \pm 0,44 \mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ($n=8$) bzw. $1,02 \pm 0,46 \mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ($n=8$) über die Baseline. Die Hemmung des ovalbumininduzierten Anstiegs des I_{sc} nach Inkubation mit BW A4C, FR 171113 sowie GB 83 erreichte statistische Signifikanz ($p<0,05$).

Die genauen Werte der Ergebnisse aus den Experimenten zur Überprüfung der Beteiligung verschiedener Mastzellmediatoren an der Reaktion auf Ovalbumin in Submukosa-Mukosa-Präparaten des distalen Kolons von Ratten, die gegen Ovalbumin sensibilisiert

3. Ergebnisse

wurden, sind in Tabelle 3.6. aufgeführt. Eine graphische Darstellung der Auswertung der oben beschriebenen Experimente zeigt Abbildung 3.25..

Die Ergebnisse der Experimente zur Beteiligung verschiedener Mastzellmediatoren an der Antwort auf die Zugabe von Ovalbumin an Submukosa-Mukosa-Präparaten aus dem distalen Kolon von sensibilisierten Ratten sprechen für die Beteiligung von Histamin, Leukotrienen und Mastzellproteasen.

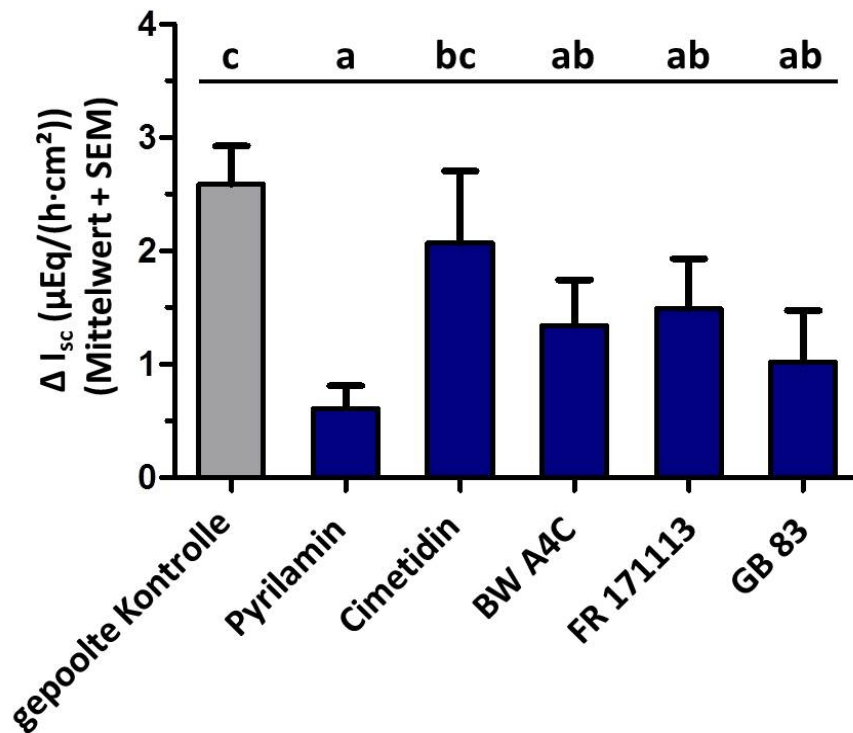


Abbildung 3.25. Antigeninduzierter Anstieg des Kurzschlussstroms über die Baseline (ΔI_{sc}) von Submukosa-Mukosa-Präparaten aus dem distalen Kolon gegen Ovalbumin sensibilisierter Ratten auf die Zugabe von Ovalbumin (100 $\mu\text{g/ml}$) unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von verschiedenen Inhibitoren. Inhibitorkonzentrationen waren: Pyrilamin, Cimetidin je 100 $\mu\text{mol/l}$, BW A4C 10 $\mu\text{mol/l}$, FR 171113 25 $\mu\text{mol/l}$, GB 83 20 $\mu\text{mol/l}$. Werte sind Mittelwerte + SEM des I_{sc} ; statistisch gesehen homogene Gruppen sind mit dem gleichen Buchstaben (a bis c) gekennzeichnet; gepoolte Kontrolle: $n=39$, Versuchsgruppen: $n=7-8$. (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3. Ergebnisse

	Anstieg des I_{sc} auf Ovalbumin (ΔI_{sc} , $\mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$) Mittelwert \pm SEM	Anzahl untersuchter Präparate n
gepoolte Kontrolle	2,59 \pm 0,36	39
+ Pyrilamin (100 $\mu\text{mol/l}$)	0,61 \pm 0,20	8
+ Cimetidin (100 $\mu\text{mol/l}$)	2,10 \pm 0,63	7
+ BW A4C (10 $\mu\text{mol/l}$)	1,34 \pm 0,40	8
+ FR 171113 (25 $\mu\text{mol/l}$)	1,49 \pm 0,44	8
+ GB 83 (20 $\mu\text{mol/l}$)	1,02 \pm 0,46	8

Tabelle 3.6. Änderung des antigeninduzierten Anstiegs des Kurzschlussstroms von Submukosa-Mukosa-Präparaten aus dem Kolon gegen Ovalbumin sensibilisierter Ratten auf die Zugabe von Ovalbumin (100 $\mu\text{g/ml}$) durch die Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren. Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} über die Baseline (ΔI_{sc}) als Mittelwert \pm SEM.

3.4.1.3. Änderung der parazellulären Permeabilität

Parallel zur Untersuchung der Transportvorgänge am Epithel mittels Erfassung des I_{sc} wurde die parazelluläre Permeabilität durch die Bestimmung des Fluxes eines passiv transportierten Markers von mukosal nach serosal erfasst. Nach der Bestimmung des basalen Fluorescein-Fluxes in zwei 30-minütigen Messperioden (zwischen t_0 und t_{60} , siehe 2.14.), wurde das Antigen appliziert und die Änderung der Transportrate in drei weiteren Messperioden (t_{60} bis t_{150}) erfasst.

Zur Auswertung der Änderung der parazellulären Transportraten nach Zugabe von Ovalbumin wurde eine möglichst breite Datenmenge herangezogen. Es wurden die ermittelten Fluxe aller Kontrollgruppen aus den Versuchen zur Ermittlung der Beteiligung von Mastzellmediatoren in einer gepoolten Kontrollgruppe zusammengefasst (analog zum Vorgehen bei der Auswertung der unter 3.4.1.2. beschriebenen Versuche, $n=39$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.26. dargestellt. Die Fluxe 1 und 2, die vor der Zugabe des Antigens ermittelt wurden, lagen bei $1,25 \pm 0,14$ $\text{nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ bzw. $1,15 \pm 0,14$ $\text{nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$. Nach Antigenzugabe konnte für Flux 3 ein Wert von $1,25 \pm 0,16$ $\text{nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ermittelt werden. Die Fluxe 4 und 5 wiesen mit Werten von $1,33 \pm 0,28$ $\text{nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ bzw. $1,50 \pm 0,28$ $\text{nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ zwar höhere Transportraten auf, die statisti-

3. Ergebnisse

sche Analyse der Daten ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen ermittelten Fluxen. Im distalen Kolon konnte eine Veränderung der parazellulären Permeabilität durch die Zugabe von Ovalbumin zu Submukosa-Mukosa-Präparaten aus dem Kolon der gegen Ovalbumin sensibilisierten Tiere demnach nicht nachgewiesen werden. Da scheinbar kein Effekt durch die Antigengabe entsteht, wurde hier auf eine Analyse der Wirkung der verwendeten Blocker verschiedener Mastzellmediatoren und ihren Einfluss auf die parazelluläre Transportrate verzichtet.

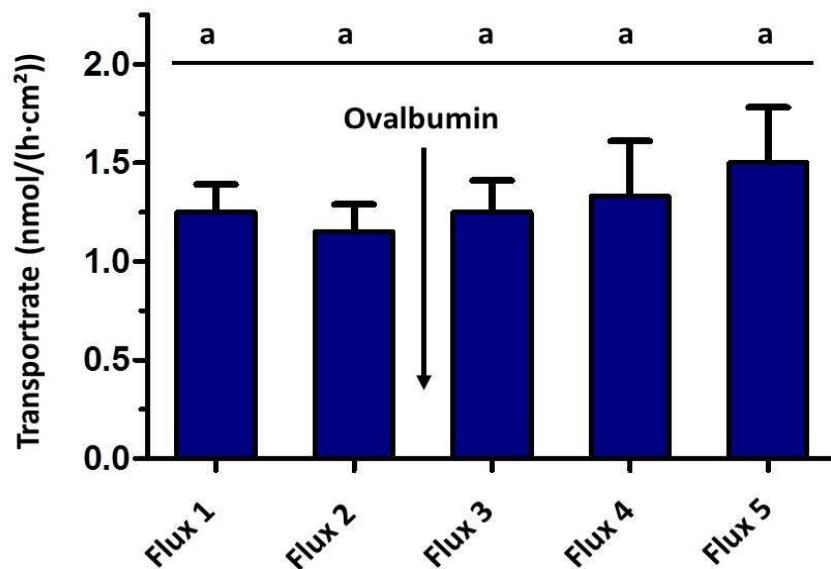


Abbildung 3.26. Parazelluläre Transportrate für Fluorescein von mukosal nach serosal in Submukosa-Mukosa-Präparaten aus dem distalen Kolon gegen Ovalbumin sensibilisierter Ratten; Fluxe 1-2 vor Antigenzugabe, Fluxe 3-5 nach Antigenzugabe (Ovalbumin 100 µg/ml); Mittelwerte + SEM der gepoolten Kontrollgruppe (n=39). (Publiziert in Bell et al. 2014.)

3. Ergebnisse

3.4.2. Antigeninduzierte Veränderungen des Kurzschlussstroms und der parazellulären Fluxe am Jejunum

Neben Kolonpräparaten wurden – wie oben dargelegt – auch Jejunumsegmente aus den sensibilisierten Ratten gewonnen und in Ussingkammer-Messungen untersucht (siehe 2.5.2.). Dies war vor allem im Hinblick auf die Bestimmung der parazellulären Permeabilität interessant, da es sich bei dem Epithel im Jejunum um ein deutlich leckeres Epithel als beim Kolonepithel handelt (Markov et al. 2010).

3.4.2.1. Änderung des Kurzschlussstroms

Auch in Ussingkammer-Messungen an Jejunumsegmenten der sensibilisierten Ratten führte die Gabe von Ovalbumin (100 µg/ml) zu einem schnellen, statistisch signifikanten Anstieg des I_{sc} , dessen Peak einen Mittelwert von $1,89 \pm 0,58 \mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ($n=8$, $p<0,05$) oberhalb der Baseline aufwies. Der zeitliche Verlauf der Reaktion unterschied sich nicht von der Antwort, die in Submukosa-Mukosa-Präparaten des distalen Kolons aufgezeichnet wurde (siehe dazu Abbildung 3.24.). Die Zugabe von Ovalbumin in Ussingkammern, in denen Jejunumsegmente von Kontrolltieren, also ohne vorangegangene Sensibilisierung gegen Ovalbumin, eingespannt waren, bewirkte keine Veränderung des I_{sc} . Der Mittelwert des gemessenen Maximums nach Zugabe von Ovalbumin lag in der Kontrollgruppe lediglich um $0,08 \pm 0,036 \mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ($n=8$) oberhalb der Baseline.

3.4.2.2. Beteiligung verschiedener Mastzellmediatoren

Zur Charakterisierung der an der Antwort des Jejunums beteiligten Mastzellmediatoren wurden die gleichen Inhibitoren wie bei den Kolonpräparaten getestet. Analog zu den Versuchen am Kolon diente immer ein Dünndarmpräparat als Kontrolle, in der die Antwort auf das Antigen in vitro in Abwesenheit von potenziellen Inhibitoren gemessen wurde, während in einem zweiten Präparat die Antwort auf das Antigen in Gegenwart der jeweiligen Blockersubstanz getestet wurde. Analog zur Beschreibung in 3.4.1.2. erfolgte die Gruppierung der Daten in Versuchsgruppen und Kontrollgruppen. Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde auch bei der Untersuchung der Jejunumsegmente mit einer gepoolten Kontrolle gearbeitet.

3. Ergebnisse

Die gepoolte Kontrolle zeigte einen Anstieg des I_{sc} auf Ovalbumin mit einem Peak, der einen Mittelwert von $1,68 \pm 0,23 \mu\text{Eq}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$ ($n=36$) oberhalb der Baseline aufwies. Vorbehandlung mit dem Histaminrezeptor-Antagonisten Pyrilamin ($100 \mu\text{mol/l}$), der gegen den Subtyp H_1 gerichtet ist, konnte die Reaktion im Mittel zwar um etwa 50 % reduzieren (Mittelwert $0,76 \pm 0,16 \mu\text{Eq}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$) ($n=7$), es handelt sich hierbei jedoch ausschließlich um die Beobachtung eines Trends ohne statistische Signifikanz. Die Blockade der H_2 -Rezeptoren mit dem Antagonisten Cimetidin ($100 \mu\text{mol/l}$) verminderte den Peak im Vergleich zur gepoolten Kontrollgruppe um etwa 40 % (Mittelwert $0,96 \pm 0,33 \mu\text{Eq}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$) ($n=7$). Vergleichbare Ergebnisse erbrachte die Überprüfung der Beteiligung von Leukotrienen durch Inkubation mit dem Blocker der 5-Lipoxygenase BW-A4C ($10 \mu\text{mol/l}$). Hier konnte der Anstieg des I_{sc} nach Zugabe von Ovalbumin um etwa 30 % auf einen Mittelwert von $1,21 \pm 0,36 \mu\text{Eq}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$ ($n=7$) reduziert werden. Der Einsatz der Proteaserezeptor-Antagonisten FR 171113 ($25 \mu\text{mol/l}$) und GB 83 ($20 \mu\text{mol/l}$) bewirkte ebenso eine Reduktion der Peakhöhe des I_{sc} um etwa 30 % bzw. fast 60 % auf $1,23 \pm 0,51 \mu\text{Eq}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$ ($n=8$) bzw. $0,69 \pm 0,28 \mu\text{Eq}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$ ($n=7$). Aufgrund der großen Streuung der Ergebnisse sowie der kleinen Gruppengrößen von $n=7-8$ ergaben sich jedoch bei diesen Auswertungen keine statistischen Signifikanzen. Die Einzeldaten dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 3.7. und Abbildung 3.27. zusammengefasst.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Beteiligung von Mastzellmediatoren an der Vermittlung des Anstiegs des I_{sc} nach Zugabe von Ovalbumin in sensibilisierten Tieren zeigten insgesamt einen Trend, der für die Beteiligung aller untersuchter Mediatoren, also Histamin, Leukotrienen und Mastzellproteasen, spricht.

3. Ergebnisse

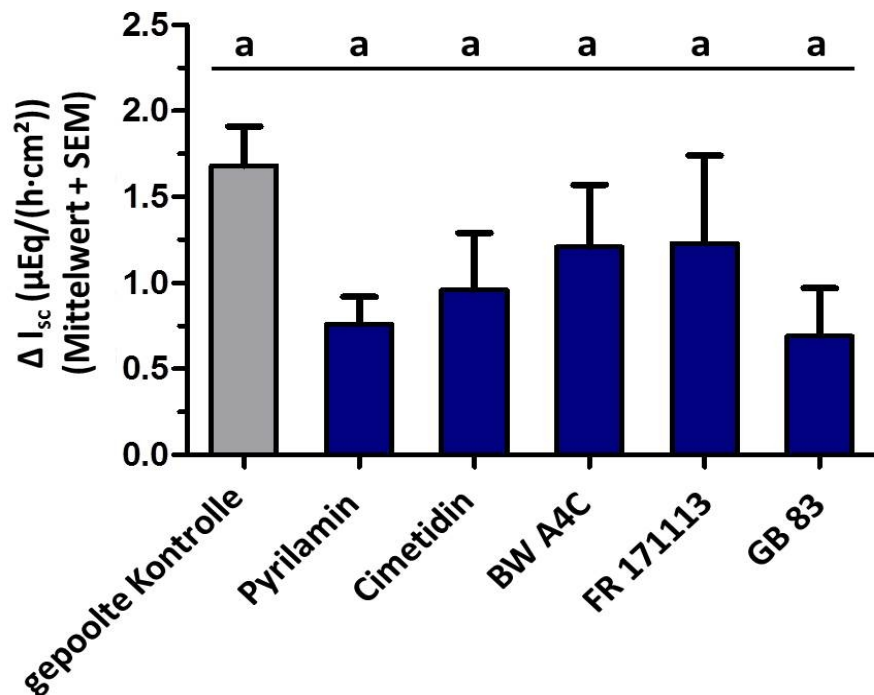


Abbildung 3.27. Antigeninduzierter Anstieg des Kurzschlussstroms über die Baseline (ΔI_{sc}) von Jejunumsegmenten gegen Ovalbumin sensibilisierter Ratten auf die Zugabe von Ovalbumin (100 $\mu\text{g/ml}$) unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von verschiedenen Inhibitoren. Inhibitorkonzentrationen waren: Pyrilamin, Cimetidin je 100 $\mu\text{mol/l}$, BW A4C 10 $\mu\text{mol/l}$, FR 171113 25 $\mu\text{mol/l}$, GB 83 20 $\mu\text{mol/l}$. Werte sind Mittelwerte + SEM des I_{sc} ; statistisch gesehen homogene Gruppen sind mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet; gepoolte Kontrolle: $n=36$, Versuchsgruppen: $n=7-8$.

3. Ergebnisse

	Anstieg des I_{sc} auf Ovalbumin (ΔI_{sc} , $\mu\text{Eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$) Mittelwert \pm SEM	Anzahl untersuchter Segmente n
gepoolte Kontrolle	1,68 \pm 0,23	36
Pyrilamin (100 $\mu\text{mol/l}$)	0,76 \pm 0,16	7
Cimetidin (100 $\mu\text{mol/l}$)	0,96 \pm 0,33	7
BW A4C (10 $\mu\text{mol/l}$)	1,21 \pm 0,36	7
FR 171113 (25 $\mu\text{mol/l}$)	1,23 \pm 0,51	8
GB 83 (20 $\mu\text{mol/l}$)	0,69 \pm 0,28	7

Tabelle 3.7. Änderung des antigeninduzierten Anstiegs des Kurzschlussstroms von Jejunumsegmenten gegen Ovalbumin sensibilisierter Ratten auf die Zugabe von Ovalbumin (100 $\mu\text{g/ml}$) durch die Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren. Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} über die Baseline (ΔI_{sc}) als Mittelwert \pm SEM.

3.4.2.3. Änderung der parazellulären Permeabilität

Die Probenentnahme zur Untersuchung der parazellulären Permeabilität der Jejunumsegmente erfolgte nach demselben Schema, das bereits in 3.4.1.3. angewendet wurde.

Abbildung 3.28. zeigt die ermittelten Transportraten für die Fluxe 1-5. Die Fluxe 1 und 2, die vor der Zugabe des Antigens Ovalbumin ermittelt wurden, wiesen Transportraten von $1,75 \pm 0,16 \text{ nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ und $1,87 \pm 0,15 \text{ nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ auf. Der erste Flux, der nach der Zugabe von Ovalbumin ermittelt wurde (Flux 3) zeigte einen leicht erhöhten Wert von $2,24 \pm 0,20 \text{ nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$. Die statistische Analyse der Daten ergab jedoch, dass die Fluxe 1-3 einer gemeinsamen, statistisch gesehen homogenen, Gruppe angehören. Die ermittelten Transportraten 4 und 5 wiesen im Gegensatz dazu stark erhöhte Werte auf. Flux 4 betrug $3,01 \pm 0,24 \text{ nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$, Flux 5 sogar $3,59 \pm 0,32 \text{ nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$. Die statistische Analyse ergab, dass die Fluxe 4 und 5 zu einer anderen, statistisch gesehen von der Gruppe Flux 1-3 verschiedenen, Gruppe gehören. Die Bestimmung der Transportrate erfolgte an allen unter 3.4.2.2. aufgeführten Ussingkammer-Experimenten. Die Gruppengröße umfasste demnach $n=36$.

3. Ergebnisse

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Transportraten im Jejunum erwartungsgemäß etwas größer sind als die gemessenen Transportraten in Kolonpräparaten. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass die Zugabe von Ovalbumin zu einem statistisch signifikanten Anstieg der parazellulären Permeabilität führt, der jedoch zeitlich etwas verzögert auftritt.

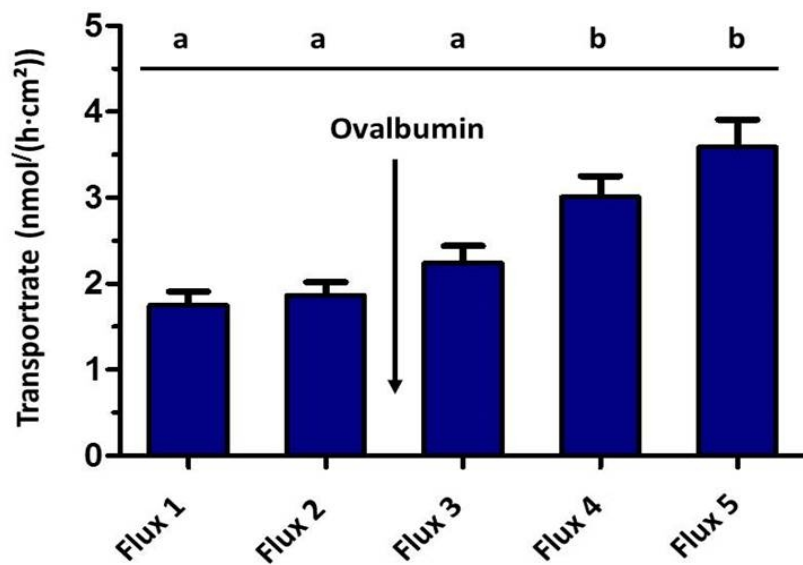


Abbildung 3.28. Parazelluläre Transportrate für Fluorescein von mukosal nach serosal in Jejunumsegmenten gegen Ovalbumin sensibilisierter Ratten; Fluxe 1-2 vor Antigenzugabe, Fluxe 3-5 nach Antigenzugabe (Ovalbumin 100 µg/ml); Mittelwerte + SEM der gepoolten Kontrollgruppe (n=36).

Nachdem ein Anstieg der Fluxrate nach Antigengabe in sensibilisierten Tieren nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt der Fragestellung nachgegangen, ob dieser Effekt durch die Verwendung verschiedener Inhibitoren (siehe 3.4.2.2.) beeinflusst werden konnte. Da die statistische Analyse ergab, dass die Fluxe zu zwei verschiedenen homogenen Gruppen gehören, wurden die Fluxe 1 und 2 (Fluxrate vor Zugabe des Antigens = Mittelwert aus Flux 1 und Flux 2) sowie die Fluxe 4 und 5 (Fluxrate nach Zugabe des Antigens = Mittelwert aus Flux 4 und Flux 5) zusammengefasst. Zur statistischen Auswertung der Änderung der Fluxraten erfolgte, analog zu

3. Ergebnisse

3.4.2.2., die Zusammenfassung der Daten in Versuchsgruppen und eine gepoolte Kontrollgruppe.

Die Analyse der Fluxraten in den einzelnen Versuchsgruppen im Hinblick auf die Beeinflussung des Anstiegs der Transportrate nach Zugabe des Antigens durch die Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren ergab jedoch aufgrund der großen Streuung und der geringen Gruppengröße in den Einzelserien (n=6-8) keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 3.8.).

	Parazelluläre Permeabilität VOR Antigenzugabe	Parazelluläre Permeabilität NACH Antigenzugabe
	Fluxe 1-2: MW ± SEM (nmol/(h·cm²))	Fluxe 4-5: MW ± SEM (nmol/(h·cm²))
Gepoolte Kontrolle	1,81 ± 0,155	3,30 ± 0,279
Pyrilamin (100 µmol/l)	1,85 ± 0,431	2,72 ± 0,146
Cimetidin (100 µmol/l)	1,35 ± 0,287	2,62 ± 0,371
BW A4C (10 µmol/l)	2,10 ± 0,240	2,90 ± 0,364
FR 171113 (25 µmol/l)	1,92 ± 0,270	3,52 ± 0,420
GB 83 (20 µmol/l)	1,88 ± 0,276	2,74 ± 0,293

Tabelle 3.8. Beeinflussung der Veränderung der Transportrate nach Zugabe von Ovalbumin (100 µg/ml) in Jejunumsegmenten gegen Ovalbumin sensibilisierter Ratten durch Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der Fluxe vor Antigenzugabe sowie nach Antigenzugabe, Kontrollgruppe: n=36, je Versuchsgruppe: n=6-8.

4. Diskussion

Die Anzahl der Menschen, die unter Nahrungsmittelunverträglichkeiten leiden, hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Die klinischen Symptome reichen hierbei von Reaktionen des Gastrointestinaltrakts, z.B. Durchfall, Erbrechen oder Bauchschmerzen, über Hautreaktionen, z.B. Ekzeme, bis hin zu Problemen im Respirations-trakt, wo es zur Ausprägung von Asthma kommen kann.

Betrachtet man die zugrunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene, so gibt es noch viele Unklarheiten. Der klassische Ablauf der IgE-vermittelten Nahrungsmittelallergie ist zwar schon lange bekannt (siehe 1.3.), jedoch bestehen bezüglich der Regulationsmechanismen, vor allem in Bezug auf die Interaktion zwischen Zellen des Immunsystems und des Nervensystems, noch große Wissenslücken. Besonderes Interesse bei der Untersuchung dieser Regulationsmechanismen kommt dabei der Rolle der enterischen Neurone zu. Das enterische Nervensystem ist dazu in der Lage, vollständig autonom, das heißt ohne dauerhafte Kommunikation mit dem zentralen Nervensystem, die Funktionen des Magen-Darm-Traktes zu regulieren (Wood 1991). Durch die Lage der enterischen Neurone in der Darmwand ergibt sich nach Aufnahme von Nahrungsmittelallergenen über den Darm eine unmittelbare Nähe zwischen Allergen, enterischen Neuronen sowie Immunzellen, die durch das Antigen angelockt werden. Die Interaktionen zwischen den enterischen Neuronen und den Immunzellen, welche im Falle der klassischen Nahrungsmittelallergie in erster Linie Mastzellen darstellen, sind bisher noch ungenügend erforscht. Meine Arbeit sollte die Wirkung von verschiedenen Mastzellmediatoren auf enterische Neurone aus dem Plexus submucosus des Kolons der Ratte charakterisieren. Der Fokus meiner Untersuchungen lag dabei auf den Effekten, die das biogene Amin Histamin, welches den zentralen Mastzellmediator darstellt (Berin und Sampson 2013), an diesen Neuronen hervorruft. Die Interaktion zwischen verschiedenen Mastzellmediatoren und submukösen Neuronen aus dem Kolon der Ratte wurde nachfolgend anhand eines von mir etablierten Co-Kultur-Modells genauer untersucht. Abschließend erfolgte die Messung der Wirkung verschiedener Mastzellmediatoren auf die Sekretion sowie die Permeabilität des Darmepithels in einem Allergiemodell.

4.1. Die Bedeutung des allergischen Mediators Histamin und seine Wirkung auf submuköse Neurone

Histamin ist ein wichtiger Mediator von Entzündungsreaktionen, der von Mastzellen und basophilen Granulozyten produziert und freigesetzt wird. Es handelt sich um ein biogenes Amin, das als parakriner Botenstoff wirkt. Histamin ist verantwortlich für die Auslösung verschiedener klinischer Symptome, die typisch für die klassische Form der Allergie, die Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I, sind. Diese Symptome können beispielsweise durch Wirkungen am Gefäßsystem (Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität) oder am Respirationstrakt (Bronchokonstriktion) ausgelöst werden (Pearce 1991) und sich als Bildung von typischen Quaddeln oder allergischem Asthma manifestieren. Histamin ist jedoch nicht nur bei allergischen Krankheitsgeschehen prominent, es dient auch als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Haas et al. 2008, Nuutinen und Panula 2011).

Die Wirkungen von Histamin am Gastrointestinaltrakt wurden in verschiedenen Studien untersucht. Im Magen stimuliert Histamin die Säuresekretion an den Parietalzellen der Magenschleimhaut (Pearce 1991, Rangachari 1992). Im Darm ist eine Erhöhung der Chloridsekretion durch Histaminapplikation in Experimenten am Kolon von Meerschweinchen beschrieben (Wang et al. 1990). Ebenfalls konnte eine Erhöhung der Chloridsekretion am Darm durch Histamin bei anderen Spezies nachgewiesen werden: unter anderem am Dünndarm (Hardcastle und Hardcastle 1987) sowie am Kolon (Schultheiss et al. 2006) von Ratten, am Kolon von Kaninchen (McCabe und Smith 1984) und am Kolon von Hunden (Rangachari und Prior 1994). Die Wirkung von Histamin auf enterische Neurone aus dem Plexus submucosus wurde bisher am besten am Meerschweinchen untersucht. Hier löst Histamin eine Depolarisation der Zellen aus (Frieling et al. 1993). Für Neurone aus dem Plexus submucosus des Menschen ist eine exzitatorische Wirkung von Histamin beschrieben (Breunig et al. 2007). Da noch keine Kenntnisse zur Wirkung von Histamin auf submuköse Neurone aus dem Kolon der Ratte vorliegen, war zunächst die Untersuchung ebendieser Wirkung Gegenstand meiner Arbeit. Histamin induzierte konzentrationsabhängig eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den submukösen Nervenzellen. Während sehr geringe Histaminkonzentrationen von 0,1 bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$ keine bzw. kaum Effekte an submukösen Neuro-

4. Diskussion

nen auslösen konnten, änderte sich mit steigender Histaminkonzentration nicht nur die Anzahl der Zellen, welche eine Reaktion auf Histamin zeigten (Abbildung 3.2. A), sondern auch die Höhe des Anstiegs in der gemessenen Fura-2-Ratio (Δ Fura-2-Ratio) und damit der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Abbildung 3.2. B). Hohe Histaminkonzentrationen von 50 bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ konnten den Großteil der untersuchten Zellen stimulieren, es war jedoch nicht möglich, eine Reaktion aller Neurone zu generieren - auch die Erhöhung der Konzentration von Histamin auf 250 $\mu\text{mol/l}$ konnte die Responderquote nicht steigern. Vergleichbare Beobachtungen konnten auch bei Betrachtung des ausgelösten Anstiegs der Fura-2-Ratio gemacht werden. Bereits ab einer Histaminkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ konnte jedoch eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel induziert werden, die mit solchen vergleichbar waren, die durch höhere Histaminkonzentrationen zu sehen waren. Die Kurve, die den Zusammenhang zwischen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und Histaminkonzentration darstellt, erreichte also schneller ihren Sättigungsbereich (Tabelle 3.1.). Die Zusammensetzung des enterischen Nervensystems aus sensorischen Neuronen, motorischen Neuronen und Interneuronen sowie die unterschiedliche Ausprägung von Neurotransmittern macht deutlich, dass die Neuronenpopulation im Darm sehr heterogen ist (Hansen 2003a). Es scheint daher nicht unwahrscheinlich zu sein, dass die Expression von Histaminrezeptoren nicht jedem Neuron des Plexus submucosus zu eigen ist.

Die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration der submukösen Neurone als Antwort auf Histamin erfolgt prompt, in der Mehrzahl der Neurone stellt sich diese Reaktion biphasisch dar. Die initiale Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels erreicht nach etwa einer Minute ihr Maximum, ein zweiter Peak, der jedoch eine deutlich kleinere Amplitude aufweist, bildet sich bei der Mehrzahl der Responder etwa zwei bis drei Minuten nach der Zugabe von Histamin aus (siehe Abbildungen 3.3. und 3.4.).

Da eine Konzentrationserhöhung von Ca^{2+} im Zytosol gemessen werden konnte, stellte sich die Frage nach der Quelle der Calciumionen. Neben der Möglichkeit der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) oder den Mitochondrien, muss auch der Eintritt von Ca^{2+} in die Zelle durch Kationenkanäle oder Transporter in der Plasmamembran in Betracht gezogen werden. Da die histamininduzierte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER in der Literatur mehrfach beschrieben wurde (zum Beispiel Wang und Large 1993, Lundius et al. 2010), wurde diese

4. Diskussion

Möglichkeit zuerst experimentell überprüft. Zu diesem Zweck wurde die ATP-abhängige Calciumpumpe des endoplasmatischen Retikulums (SERCA = sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) durch Cyclopiazonsäure (CPA) blockiert. Die SERCA transportiert Ca^{2+} aus dem Zytosol in das ER hinein und füllt so den internen Ca^{2+} -Speicher ständig wieder auf (Moncoq et al. 2007). Durch Inkubation mit dem SERCA-Blocker CPA wird der intrazelluläre Calciumspeicher kontinuierlich entleert. In Gegenwart von CPA löste Histamin keine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration mehr aus (siehe Abbildung 3.6.) Diese Beobachtung spricht für eine histamininduzierte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER.

Die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die Histamin normalerweise auslöst, wurde durch CPA nicht nur unterdrückt, sondern sogar in einen paradoxen Abfall umgekehrt (Abbildung 3.7.). Um zu überprüfen, ob es durch die Applikation von Histamin tatsächlich zu einem Transport von Ca^{2+} aus der Zelle kommt, wurde zusätzlich ein sogenannter Quenching-Versuch unter Verwendung von Manganchlorid durchgeführt. Manganionen werden von den meisten Ca^{2+} -transportierenden Kanälen und Transportern als Substrat akzeptiert, weiterhin binden sie mit sehr großer Affinität an Fura-2 (Pan et al. 2012). Der gebildete Komplex hat seine Fähigkeit zur Fluoreszenz jedoch verloren – so nimmt die am isoemissiven Punkt von Fura-2 gemessene Fura-2-Fluoreszenz kontinuierlich ab. Beim Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol kommt es ebenfalls zu einem Einstrom von Mn^{2+} , die Fluoreszenz sinkt dadurch stark ab. Umgekehrt nimmt die Fluoreszenz zu, wenn Ca^{2+} vermehrt aus dem Zytosol transportiert wird (Hallam et al. 1988).

In der Tat verminderte Histamin den Mn^{2+} -Quench des Fura-2-Signals (Abbildung 3.8.), was nur durch einen Abtransport von Ca^{2+} (Mn^{2+}) zu erklären ist. Da die SERCA, und damit die Möglichkeit der Zelle den internen Speicher ER wieder aufzufüllen, blockiert war, bestehen nur noch zwei Möglichkeiten für den Transport von Ca^{2+} aus dem Zytosol: zum einen wäre eine Aufnahme in die Mitochondrien denkbar, wahrscheinlicher ist jedoch ein Transport von Ca^{2+} aus der Zelle in den Extrazellulärraum. Dieser Transport könnte zum einen über den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher in der Plasmamembran erfolgen (Blaustein und Lederer 1999), eine weitere Möglichkeit besteht in der Nutzung von plasmamembranständigen Ca^{2+} -ATPasen, für die aber keine selektiven Inhibitoren verfügbar sind. Welche Rolle der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher spielt, wurde durch den Einsatz eines Na^+ -freien Messpuffers überprüft. Der Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentra-

4. Diskussion

tion durch Histamin nach Inkubation mit CPA war auch unter Na^+ -freien Bedingungen noch vorhanden, jedoch signifikant reduziert. Ein Transport von Ca^{2+} aus der Zelle durch den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher scheint also eine Rolle zu spielen. Der Grund für den histamininduzierten Transport von Ca^{2+} aus der Zelle bleibt unklar. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass es sich hierbei um einen Mechanismus handelt, der die Wirkung von Histamin – die Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels – begrenzt. Eine länger andauernde Erhöhung von Ca^{2+} induziert den Zelltod durch Apoptose (Harr und Distelhorst 2010). Eine Begrenzung der Antwort auf Histamin ist also eine protektive Notwendigkeit, mit welcher die Zelle ihr Überleben sichert.

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die in der Literatur häufig beschrieben wurde, ist die Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum mittels Aktivierung der Rezeptoren für Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3), die vorwiegend in der Membran des ERs lokalisiert sind (Maruyama et al. 1997). Die Blockade der IP_3 -Rezeptoren mit 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) verminderte die Anzahl der Zellen, die auf Histamin reagieren, statistisch signifikant (Abbildung 3.6. A). Die verbleibenden submukösen Neurone, die immer noch auf Histamin reagierten, zeigten nur eine geringere Zunahme der Amplitude der gemessenen Fura-2-Ratio, also einen deutlich schwächeren Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als Messungen unter Kontrollbedingungen ohne gehemmte IP_3 -Rezeptoren (Abbildung 3.6. B). Diese Ergebnisse sprechen für die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER über IP_3 -Rezeptoren als Reaktion auf Histamin. Mehrere Möglichkeiten kommen als Erklärung für die inkomplette Hemmung des Histamineffektes durch 2-APB in Betracht. Eine Möglichkeit ist die unzureichende Blockade der IP_3 -Rezeptoren durch 2-APB, zum einen durch eine zu gering gewählte Konzentration oder durch eine zu geringe Affinität der Substanz zu ihrem Zielprotein (IP_3 -Rezeptor). 2-APB wirkt als allosterischer Antagonist, der nicht direkt an der Bindungsstelle des Rezeptors bindet (Bilmen und Michelangeli 2002). Eine weitere Möglichkeit, die die beobachtete Restaktivität der submukösen Neurone nach Blockade der IP_3 -Rezeptoren erklären würde, wäre die zusätzliche Beteiligung anderer Wege der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER. Beschrieben sind hier die Ryanodinrezeptoren, die, ebenso wie IP_3 -Rezeptoren, vorwiegend in der Membran des ER lokalisiert sind und bei Aktivierung eine Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol bewirken (Segal und Korkotian 2014).

4. Diskussion

Eine Versuchsserie mit Ca^{2+} -freiem Messpuffer konnte den initial ausgeprägten, größeren ersten Peak nicht beeinflussen, wohingegen der darauffolgende zweite Anstieg der Amplitude der gemessenen Fura-2-Ratio ausblieb (siehe Abbildung 3.5.). Diese Beobachtung stützt die Schlussfolgerung, dass der unmittelbar nach Histaminapplikation beobachtete Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol nicht durch den Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum bedingt ist. Der zweite, weniger prägnant ausgebildete Peak, der nur von etwa zwei Dritteln der Responder ausgebildet wird, entsteht jedoch offenbar durch den Einstrom von Ca^{2+} über die Plasmamembran. Die Entleerung von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern führt an vielen Zellen zu einem verzögerten Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum über speichergesteuerte Kationenkanäle. Diese lassen sich durch Lanthanide wie etwa Gd^{3+} blockieren (Parekh und Penner 1997). Submuköse Neurone, die vor der Histaminapplikation mit Gd^{3+} inkubiert wurden, zeigten erwartungsgemäß nur den initialen ersten Peak, der verzögert auftretende zweite Peak trat, wie unter Ca^{2+} -freien Bedingungen, nicht auf.

Es wurde bereits für viele Gewebe und Zellen eine Ca^{2+} -Abhängigkeit der H_1 -Rezeptor-Antworten auf Histamin beschrieben (zum Beispiel Claro et al. 1989, Donaldson et al. 1989, Leurs et al. 1991). Die Hypothese von Michel besagt, dass es durch die histamin-induzierte Produktion von Inositolphosphaten zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt. Dabei ist der wichtigste Metabolit, IP_3 , verantwortlich für die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, während der sekundäre Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf einem Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum beruht (Michel 1975, Berridge 1992). Dies ist gut belegt für CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen, die den H_1 -Rezeptor des Meerschweinchens exprimieren (Leurs et al. 1994).

Gebildet wird Histamin aus der Aminosäure Histidin. Das verantwortliche Enzym, die Histidindecaboxylase, spaltet CO_2 von Histidin ab, wodurch Histamin entsteht (Iwabuchi et al. 2004). Die Bildung von Histamin in Neuronen konnte mehrfach nachgewiesen werden. Im zentralen Nervensystem gibt es eine Gruppe hypothalamischer Neurone, die Histamin synthetisieren können. Diese werden als histaminerge Neurone bezeichnet (Walker et al. 2013). Um zu überprüfen, ob eine Histaminsynthese auch in submukösen Neuronen aus dem Kolon der Ratte stattfindet, wurden zunächst immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die Histidindecaboxylase, immer in Kombination

4. Diskussion

mit der Verwendung des neuronalen Markers MAP2, um die neuronale Lokalisation sicherzustellen, durchgeführt. Es konnte eine Immunreaktion zwischen dem primären Antikörper und kultivierten submukösen Neuronen nachgewiesen werden (Abbildung 3.15.). Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde im Anschluss eine RT-PCR aus Isolaten homogenisierter Submukosa mit Primern für die Histidindecaboxylase durchgeführt. Dieser Versuch konnte die Expression des Enzyms auf mRNA Ebene nachweisen (Abbildung 3.16.). Die Ergebnisse sprechen für die Fähigkeit submuköser Neurone Histamin mithilfe des Enzyms Histidindecaboxylase zu synthetisieren. Ob in den submukösen Neuronen tatsächlich präformiertes Histamin vorliegt und, wenn ja, in welchem Umfang, wurde in dieser Studie jedoch nicht überprüft.

Histamin wirkt über die Bindung an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Plasmamembran der Zielzellen. Es sind verschiedene Subtypen von Histaminrezeptoren, die als H_1 -, H_2 -, H_3 - sowie H_4 -Rezeptoren bezeichnet werden, bekannt. Für die verschiedenen Subtypen der Histaminrezeptoren sind verschiedene Lokalisationen, verschiedene Aufgaben und verschiedene Signalkaskaden in der Literatur beschrieben.

Histaminrezeptoren vom Subtyp H_1 haben eine molekulare Masse von 56 kDa (487 Aminosäuren) (Haas et al. 2008) und sind klassischerweise an $G_{q/11}$ -Proteine gekoppelt (Leurs et al. 1995, Hill et al. 1997). Hierbei kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C, die den second messenger IP_3 und DAG bildet. IP_3 bewirkt eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern in das Zytosol, Ca^{2+} und DAG aktivieren im nächsten Schritt die Proteinkinase C und ermöglichen so die Phosphorylierung verschiedener Proteine (siehe 1.7.). Alternativ zu PIP_2 , welches der Bildung von IP_3 dient, können jedoch auch verwandte Membranlipide gespalten werden. Beispielsweise kann H_1 -vermittelt die Phospholipase A_2 Arachidonsäure aus Membranphospholipiden abspalten, welche das Ausgangsprodukt für die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen darstellt (Hill et al. 1997). Ein weiterer beschriebener Signalweg für den Histamin H_1 -Rezeptor stellt die Aktivierung der NO-Synthase dar. NO aktiviert daraufhin die lösliche Guanylatcyclase, welche eine Absenkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vermittelt (Hill et al. 1997). Häufig beschriebene Wirkungen der Aktivierung des Histamin H_1 -Rezeptors sind beispielsweise die Kontraktion glatter Muskulatur, die Dilatation von Arteriolen und Kapillaren sowie die Stimulation afferenter Neurone (Stark 2007).

4. Diskussion

Histamin- H_2 -Rezeptoren haben eine molekulare Masse von 40 kDa (359 Aminosäuren). Genauso wie H_1 -Rezeptoren sind sie sich in ihrer Struktur tierartübergreifend sehr ähnlich (Haas et al. 2008). Die Aktivierung des Histaminrezeptors vom Subtyp H_2 ist für viele Gewebe mit der nachfolgenden Stimulation eines $G_{s/olf}$ -Proteins verbunden. Durch die Stimulation des $G_{s/olf}$ -Proteins kommt es zur Aktivierung der Adenylatcyclase. Diese stellt ein Enzym dar, welches aus Adenosintriphosphat (ATP) cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) abspaltet, wodurch sich dessen Konzentration in der Zelle erhöht; cAMP wirkt nun als second messenger, es aktiviert seinerseits das Enzym Proteinkinase A, welches für die Phosphorylierung von Proteinen zuständig ist. Damit reguliert die Proteinkinase A die Aktivität von Enzymen und Transkriptionsfaktoren. Ein solcher Signalweg wurde beispielsweise für H_2 -Rezeptoren in Magen (Kopic und Geibel 2013), Gehirn, Herz und glatter Muskulatur des Uterus, der Atemwege und der Gefäße beschrieben (Leurs et al. 1995). Es gibt jedoch auch andere H_2 -vermittelte Signaltransduktionswege. In den Parietalzellen des Magens wurde beispielsweise ein Ca^{2+} -vermittelter Signalweg, wie er bereits für den H_1 -Rezeptor aufgezeigt wurde, beschrieben (Hill et al. 1997). Ein weiteres Beispiel für andere Signaltransduktionswege zeigten Experimente mit CHO-Zellen, die geklonte H_2 -Rezeptoren der Ratte trugen. Hier wurde durch Stimulation des H_2 -Rezeptors neben einem massiven Anstieg von cAMP auch die Freisetzung von Arachidonsäure blockiert. Dieser inhibitorische Effekt wurde durch purinerge Rezeptoren vermittelt (Leurs et al. 1995). Es sind verschiedene H_2 -vermittelte Wirkungen an unterschiedlichen Organsystemen beschrieben. Im Herz vermitteln H_2 -Rezeptoren eine positiv inotrope sowie positiv chronotrope Wirkung auf Vorhöfe und Kammern, in Immunzellen können verschiedene Funktionen unterdrückt werden (ein Beispiel ist die Reduktion der Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten und Mastzellen) und in der glatten Muskulatur vermitteln H_2 -Rezeptoren meist eine Relaxation. Die physiologisch bedeutsamste Aufgabe von H_2 -Rezeptoren liegt jedoch in der Stimulation der Magensäuresekretion in den Parietalzellen des Magens (Hill et al. 1997, Stark 2007).

Histaminrezeptoren vom Subtyp H_3 wurden erstmals 1983 beschrieben, sie stellen ebenfalls G-Protein-gekoppelte Rezeptoren dar. Sie haben eine molekulare Masse von 70 kDa (445 Aminosäuren). H_3 -Rezeptoren haben viele verschiedene splice-Varianten, wodurch sich, im Gegensatz zu den Histaminrezeptoren H_1 und H_2 , eine große Anzahl von Rezeptor-Isoformen mit unterschiedlicher Verteilung und Pharmakologie ergibt (Haas et

4. Diskussion

al. 2008). Der klassische Signalweg, welcher für H_3 -Rezeptoren beschrieben ist, stellt die Aktivierung eines $G_{i/o}$ -Proteins dar. Bei diesem G-Protein handelt es sich um ein inhibitorisches G-Protein. Durch seine Stimulation kommt es zur Hemmung der Adenylatcyclase. Dies resultiert in der Senkung des Spiegels von cAMP und damit in einer verminderten Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A. Weitere beschriebene Signaltransduktionswege sind die negative Kopplung an Pertussis-Toxin-sensitive Ca^{2+} -Kanäle (N- und P-Typ), sowie die Aktivierung der MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase), welche durch den Cross-talk mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zustande kommt (Stark 2007, Haas et al. 2008). Histaminrezeptoren vom Subtyp H_3 werden vorwiegend neuronal im zentralen Nervensystem exprimiert. Hier sind sie typischerweise präsynaptisch lokalisiert und unterdrücken die Auslösung von Aktionspotentialen sowie die Histaminsynthese. Des Weiteren kontrollieren sie über die Regulation der Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter wie Acetylcholin, biogene Amine, GABA oder Glutamat (Haas et al. 2008). Über ihre Wirkmechanismen sind sie an der zentralen Regulation von Durst, Hunger, Körpertemperatur und Blutdruck beteiligt. H_3 -Rezeptoren wurden jedoch auch außerhalb des zentralen Nervensystems nachgewiesen. Sie finden sich zum Beispiel auf Zellen aus Lunge, Gastrointestinaltrakt und Pankreas des Meerschweinchens (Hill et al. 1997).

Der letzte bekannte Subtyp von Histaminrezeptoren ist der H_4 -Rezeptor. Dieser Rezeptor ähnelt in seinem Aufbau dem H_3 -Rezeptor. Durch zwei große Introns und drei Exons gibt es zwischen verschiedenen Spezies große Variationen des Rezeptors (Stark 2007). Für H_4 -Rezeptoren sind die gleichen Signaltransduktionswege beschrieben wie für H_3 -Rezeptoren. Ausgebildet werden H_4 -Rezeptoren vorwiegend auf Immunzellen, sie wurden auf eosinophilen Granulozyten, T-Zellen, basophilen Granulozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen nachgewiesen. Ihre Aufgabe ist vor allem die Vermittlung der Chemotaxis von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten sowie die Kontrolle der Zytokinfreisetzung aus dendritischen Zellen und T-Zellen. Dementsprechend zeigen sie allgemein eine anti-inflammatorische Wirkung. Weiterhin wurden H_4 -Rezeptoren in der Milz, im Gastrointestinaltrakt, im Gehirn des Menschen (Stark 2007) sowie in Lunge und Leber (Haas et al. 2008) nachgewiesen.

Über die Expression der verschiedenen Histaminrezeptor-Subtypen an submukösen Neuronen aus dem Kolon der Ratte war bisher nichts bekannt. Ein erstes Screening un-

4. Diskussion

ter Verwendung eines Isolats homogenisierter Submukosa aus dem Kolon der Ratte mittels RT-PCR zeigte die Expression der Rezeptorsubtypen H_1 , H_2 und H_3 an (Abbildung 3.9.). Der H_4 -Rezeptor konnte nicht nachgewiesen werden und wurde aus diesem Grund bei den nachfolgenden Versuchen zur Identifizierung beteiligter Histaminrezeptor-Subtypen nicht weiter berücksichtigt. Immunzytochemische Färbungen primär kultivierter submuköser Neurone (identifiziert über den neuronalen Marker MAP2) bestätigten die Expression von H_1 -, H_2 - und H_3 -Rezeptoren (Abbildung 3.10.).

Selektive Agonisten von H_1 -, H_2 - und H_3 -Rezeptoren konnten die Reaktion auf Histamin in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten nachahmen - alle drei verwendeten Substanzen riefen eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel hervor (Abbildung 3.11. bzw. Tabelle 3.3.). Submuköse Neurone aus dem Kolon der Ratte tragen folglich Histamin-Rezeptoren der Subtypen H_1 , H_2 und H_3 . Die Präinkubation mit dem Neurotoxin Tetrodotoxin konnte die neuronale Reaktion auf Histamin nicht unterdrücken. Diese Beobachtung spricht ebenfalls für die direkte Stimulation der enterischen Neurone über Histaminrezeptoren auf der Plasmamembran, da eine Blockade der Weiterleitung von Aktionspotentialen die Antwort nicht beeinträchtigte.

Welche Histaminrezeptor-Subtypen nun an der beobachteten Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den untersuchten submukösen Neuronen beteiligt waren, sollte durch die Inkubation mit selektiven Rezeptorantagonisten gegen die drei nachgewiesenen Rezeptoren vor Histaminzugabe herausgefunden werden. Der H_1 -Antagonist Pyrilamin konnte, ebenso wie der H_2 -Antagonist Cimetidin, sowohl die Anzahl der Responder als auch die Höhe des ausgebildeten Peaks der gemessenen Fura-2-Ratio statistisch signifikant reduzieren (Abbildungen 3.12. und 3.13.). Die Blockade der H_3 -Rezeptoren mit Thioperamid war hingegen wirkungslos (Abbildung 3.13.). Die Ergebnisse sprechen für eine Vermittlung des beobachteten Effektes durch die Histaminrezeptor-Subtypen H_1 und H_2 . Der Einsatz einer Kombination aller drei Inhibitoren in einem Cocktail konnte den stärksten erzielten Effekt, hervorgerufen durch den H_1 -Antagonisten Pyrilamin, nicht vergrößern (Abbildung 3.13.).

Studien an submukösen Neuronen aus dem Kolon von Meerschweinchen zeigten einen H_2 -vermittelten Effekt von Histamin (Frieling et al. 1993). In Neuronen aus dem Plexus submucosus des Menschen konnte dagegen eine Aktivierung durch Histamin über alle

4. Diskussion

vier Histaminrezeptor-Subtypen nachgewiesen werden (Breunig et al. 2007). Die Unwirksamkeit des H₃-Antagonisten Thioperamid könnte bedeuten, dass H₃-Rezeptoren bei der Ausprägung der Reaktion eine untergeordnete Rolle spielen. Vergleichbare Ergebnisse mit dem H₃-Antagonisten Thioperamid konnten auch in Ussingkammer-Versuchen mit Kolonpräparaten von Hunden erzielt werden – Histamin bewirkt dort eine Erhöhung des I_{sc}, welche H₁- und H₂-vermittelt ist - Thioperamid war auch in dieser Arbeit unwirksam (Rangachari und Prior 1994). Da die Expression von H₃-Rezeptoren in submukösen Neuronen jedoch mittels RT-PCR, indirekter Immunfluoreszenz sowie durch den Einsatz eines selektiven Rezeptoragonisten nachgewiesen wurde, könnte auch der eingesetzte Inhibitor Thioperamid, bei dem es sich um einen inversen Agonisten handelt (Schwartz 2011), der die Rezeptoraktivität noch unter Basalniveau senkt, nicht ausreichend wirksam sein. Die Tatsache, dass die Blockade des Histamineffektes auch durch die Kombination der verschiedenen verwendeten Inhibitoren nicht vollständig ausfiel, könnte bedeuten, dass die eingesetzte Konzentration der Antagonisten im Vergleich zur eingesetzten Histaminkonzentration nicht ausreichend war. Da es sich bei Cimetidin und Pyrilamin um kompetitive Hemmstoffe (Göthert und Schlicker 2001, Breunig 2006) handelt, kommt es zu einer Konkurrenz um die Bindungsstelle am Histaminrezeptor. Da auch durch die Kombination der Antagonisten keine gesteigerte Hemmung der Reaktion auf Histamin festgestellt werden konnte, liegt offenkundig kein additiver Effekt vor. Ob submuköse Neurone, die Histaminrezeptoren tragen, nur einen oder mehrere Subtypen dieser Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, konnte auch nach Abschluss der Experimente nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Da es bei der Applikation von Histamin zu einer Desensitivierung kommt, die nochmalige Applikation der Substanz also eine deutlich kleinere Reaktion hervorruft als die erste Gabe, war eine funktionelle Überprüfung dieser Fragestellung durch Einsatz verschiedener Antagonisten an derselben Zelle nicht möglich. Auch immunzytochemisch konnte dieser Fragestellung nicht nachgegangen werden, da alle verwendeten Antikörper, die gegen die Histaminrezeptor-Subtypen gerichtet waren, aus der gleichen Spezies stammten und somit Doppel- oder Dreifachmarkierungen nicht möglich waren (Tabelle 2.1.).

4.2. Interaktionen zwischen submukösen Neuronen und RBL-2H3-Zellen in der Co-Kultur

Beim Ablauf der klassischen Nahrungsmittelallergie handelt es sich um eine Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I. Diese Allergieform entsteht durch die Bildung spezifischer Antikörper vom Typ IgE, die gegen ein bestimmtes Allergen gerichtet sind. Diese IgEs binden mit ihrem Fc-Teil hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf der Oberfläche von Mastzellen. Diesen ersten Schritt der Allergie bezeichnet man als Sensibilisierung. Kommt es zu einem erneuten Antigenkontakt, so binden die IgE-Antikörper die Allergene, wodurch es zur Vernetzung der FcεRI kommt. Dieses Cross-linking führt zur Aktivierung mit nachfolgender Degranulation der Mastzelle. Dadurch kommt es zur Freisetzung präformierter Mediatoren, zu denen Histamin und Mastzellproteasen zählen, sowie zur Induktion der Bildung und Freisetzung weiterer Mediatoren, zu denen die Arachidonsäuremetaboliten Prostaglandine und Leukotriene zählen. Diese Mediatoren vermitteln die klassischen Symptome der Allergie vom Typ I innerhalb von Sekunden bis hin zu wenigen Minuten. Die Ausprägung verschiedener Symptome an Effektororganen ist dabei auch abhängig von Neuronen. Dieser Zusammenhang konnte in verschiedenen Studien an unterschiedlichen Allergiemodellen aufgezeigt werden. Untersuchungen an Meerschweinchen, die gegen *Trichinella spiralis* sensibilisiert wurden, zeigten bei Antigenexposition eine Erhöhung des Kurzschlussstroms – dieser Anstieg konnte durch das Neurotoxin Tetrodotoxin, welches die Weiterleitung von Aktionspotentialen unterbindet, signifikant vermindert werden (Russel und Castro 1989, Wang et al. 1991). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in Ussingkammer-Versuchen mit Ratten, die gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden, erzielt werden (Hug et al. 1996). Die neuroimmune Kommunikation ist auch eine mögliche Erklärung für die psychologische Komponente der Nahrungsmittelallergie – das GALT ist innerviert, das enterische Nervensystem wird wiederum von Mediatoren aus Immunzellen und Entzündungszellen stimuliert (Kelsay 2003).

Verschiedene Studien zeigen auch eine Beteiligung von Mastzellen an entzündlichen Darmerkrankungen auf. Da hier selten eine Mastzelldegranulation beobachtet werden kann, wird davon ausgegangen, dass es neben der klassischen Degranulation für die Mastzelle auch die Möglichkeit zur selektiven Freisetzung ihrer Mediatoren gibt (Theoharides et al. 2012). Dazu zählt zum Beispiel die sogenannte „piecemeal degranulation“.

4. Diskussion

Hier kommt es zur intrazellulären Fusion der Granula mit nachfolgender Ausbildung von Kanälen, die mit der Zellmembran in Kontakt treten. Über diese kann eine stückweise Freisetzung von Mediatoren erfolgen (Dvorak et al. 1992, Maurer 2011). Diese Form der Freisetzung könnte auch für die spontane Freisetzung geringer Mengen an Histamin verantwortlich sein und physiologische Funktion haben (Maurer 2011).

Beim Thema Mastzellen ist es wichtig, nicht ausschließlich ihre pathophysiologischen Aspekte im Fokus zu haben. Mastzellen sind neben der Vermittlung von Entzündungsreaktionen auch dazu in der Lage diese zu unterdrücken. Ein Beispiel sind Mastzellproteasen: freigesetzte Proteasen (z.B. β -Tryptase) können IgE spalten, was eine Verminderung der Entzündungssymptomatik zur Folge hat. Der mögliche Mechanismus könnte über regulatorische T-Zellen führen. Diese bilden IL-9, welches Mastzellen aktiviert. Es kommt daraufhin zur Produktion von IL-10 durch die Mastzellen. IL-10 vermindert die Entzündungsantwort, es ist beispielsweise wichtig für die Begrenzung der Immunantwort von chronisch entzündeter Haut bei Kontaktallergien (Kraneveld et al. 2012). Es wird vermutet, dass die Mastzellen ihre Umgebung analysieren und entscheiden können, ob sie eine suppressive Wirkung entfalten oder nicht. Möglicherweise wird dies vermittelt über den Zelloberflächenrezeptor siglec 8 (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 8), welcher wahrscheinlich eine inhibitorische Funktion ausübt (Kraneveld et al. 2012).

Mastzellen spielen auch bei physiologischen Vorgängen eine Rolle. Sie sind wichtig bei der Wundheilung, der Regulation des Blutflusses und der Gerinnung und spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase in verschiedenen Geweben (Rao und Brown 2008, Bischoff 2009). Im Jahr 2012 wurde erstmals beschrieben, dass die Fettresorption im Dünndarm physiologischerweise zur Degranulation von Mastzellen und Freisetzung präformierter und de novo synthetisierter Mastzellmediatoren führt (Ji et al. 2012).

Da Mastzellen eine zentrale Rolle bei der klassischen Allergie spielen und über ihre Kommunikation mit Neuronen des enterischen Nervensystems kaum Daten vorliegen, war ein Ziel meiner Arbeit die genauere Untersuchung der Kommunikation zwischen Mastzellen und submukösen Neuronen aus dem Kolon der Ratte. Dazu wurde zunächst ein Co-Kultur-Modell entwickelt, welches aus kultivierten submukösen Neuronen des

4. Diskussion

Kolons der Ratte und der Mastzelllinie RBL-2H3 bestand. Die Co-Kultivierung beider Zelltypen diente dem Zweck, die Überprüfung der Reaktionen der submukösen Neurone auf die Degranulation der RBL-2H3-Zellen zu ermöglichen. Die Zelllinie RBL-2H3 wurde in zahlreichen Publikationen erfolgreich anstelle von isolierten Mastzellen verwendet (zum Beispiel: Fischer et al. 1995). Es ist erwiesen, dass die Zellen der Linie RBL-2H3 Mastzellmediatoren synthetisieren und durch Aktivierung mittels Degranulation freisetzen (Kulczycki et al. 1974, Barsumian et. al. 1981). Die Nutzung von RBL-2H3-Zellen anstelle von isolierten Mastzellen derselben Ratten, die auch der Isolation der submukösen Neurone dienten, hatte entscheidende Vorteile: Da es sich um eine permanente basophile Zelllinie der Ratte handelt, standen die Zellen jederzeit in vergleichbarer Qualität und Menge zur Verfügung. Der limitierende Faktor war also ausschließlich die erfolgreiche Isolation und Kultivierung der submukösen Neurone. Des Weiteren ist lediglich die Gewinnung von peritonealen Mastzellen (oder beim Nager bezeichnet als „connective tissue mast cells“) – mittels eines Dichtegradienten (Zentrifugation mit Percoll) - beschrieben (Enerbäck und Svensson 1980, Knudsen und Johansen 1989). Da es sich bei Mastzellen jedoch um sehr heterogene Zellen handelt, sich also peritoneale Mastzellen wiederum sehr von mukosalen Mastzellen unterscheiden können (Irani und Schwartz 1989, Moon et al. 2010), hätte die Verwendung von isolierten peritonealen Mastzellen auch keinen entscheidenden Vorteil gegenüber der Nutzung der Zelllinie RBL-2H3 gehabt.

Um eine erfolgreiche Co-Kultivierung beider Zelltypen miteinander zu erreichen, mussten zunächst die submukösen Neurone für einen Tag kultiviert werden, um ihnen die erneute Differenzierung in der frisch hergestellten Primärkultur zu ermöglichen. Dieser Schritt erfolgte in einem speziell auf Neurone zugeschnittenen Zellkulturmedium (Neurobasal-A-Medium). Nach erfolgreichem Anwachsen der Neurone wurden die RBL-2H3-Zellen in die Kultur verbracht – um ein gemeinsames Wachstum zu ermöglichen war jedoch ein Wechsel zu Mem α -Medium notwendig. Eine gemeinsame Kultivierung in Neurobasal-A-Medium war nicht möglich. Die Gründe hierfür sind nicht geklärt. Eine Erklärung ist möglicherweise die Wirkung von nerve growth factor (NGF), welcher Zellkulturmedien zur Kultivierung von Neuronen zugesetzt wird. Die Wirkung von NGF erfolgt über die Interaktion mit zwei verschiedenen Rezeptorproteinen: high-affinity tyrosine kinase receptor sowie low-affinity p75 neurotrophin receptor – diese sind

4. Diskussion

auf diversen Immunzellen, unter Anderem auch auf Mastzellen, nachweisbar (Štampelj und Ferjan 2005). Die Stimulation dieser Rezeptoren durch NGF führt in Mastzellen zur Aktivierung und damit zur Degranulation (Pearce und Thompson 1986). Die dauerhafte Stimulation der Mastzellen durch NGF und die ständige Auseinandersetzung der submukösen Neurone mit den daraufhin sezernierten Mediatoren könnte den Kultivierungserfolg unmöglich gemacht haben. In der Literatur ist ein Fall beschrieben, in welchem der Versuch der Co-Kultivierung von myenterischen Neuronen der Ratte und peritonealen Mastzellen erfolglos blieb. In diesem Fall wurde kein Mediumwechsel durchgeführt, dies könnte ein Indiz für ein Problem mit einem mediumspezifischen Inhaltsstoff, beispielsweise NGF, sein (Sand et al. 2009).

Um eine Aktivierung mit nachfolgender Degranulation der RBL-2H3-Zellen in der Co-Kultur zu erreichen, wurde die Substanz Compound 48/80 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Polymer, welches bei der Kondensation von N-Methyl-p-Methoxyphenethylamin mit Formaldehyd entsteht – seine Wirkung als Mastzelldegranulator wurde erstmals 1951 beschrieben (Paton 1951). Vorversuche, die zeigten, dass Compound 48/80 an kultivierten RBL-2H3-Zellen eine Erhöhung der Fura-2-Ratio hervorrief, ließen auf die Wirksamkeit von Compound 48/80 schließen und dienten zur Konzentrationsfindung. Die Erhöhung der Fura-2-Ratio ist gleichbedeutend mit der Zunahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den RBL-2H3-Zellen. Die Mastzelldegranulation nach Cross-linking der IgE-Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche beinhaltet eine Ca^{2+} -abhängige Exozytose der präformierten Mediatoren (Hepp et al. 2005). Bei der Exozytose kommt es zunächst zum Kontakt zwischen Plasmamembran und der Membran des Vesikels. Zwischen beiden Membranen liegen die beteiligten SNARE-(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors) Proteine in ihrer aktivierten Form vor. Im letzten Schritt wird eine Fusionspore (sie wird auch als Porosom bezeichnet) gebildet, die die komplette Verschmelzung der beiden Membranen darstellt. Die Bildung des Porosoms ist abhängig von Ca^{2+} und spezifischen zellsekretorischen Proteinen, die als SNAREs bezeichnet werden. Durch die Porosomen kann eine gezielte Freisetzung nach extrazellulär erfolgen, die treibende Kraft ist der Druck, der durch schnellen Wasser- und Ioneneinstrom in den Vesikel entsteht. Dadurch kommt es zum Anschwellen (Volumenzunahme) des Vesikels – es gibt einen direkten Zusammenhang

4. Diskussion

zwischen dem Grad der Schwellung und der Stärke der Vesikelentleerung (Baram et al. 2001, Trikha et al. 2010).

Compound 48/80 löste an primär kultivierten submukösen Neuronen keine Änderung der gemessenen Fura-2-Ratio aus (Abbildungen 3.17. A und 3.18.). Die Zellkultur der submukösen Neurone scheint also keine Mastzellen mehr zu enthalten. Des Weiteren kann durch diesen Vorversuch davon ausgegangen werden, dass Compound 48/80 keinen direkten Effekt auf die kultivierten Neurone ausübt. Diese Beobachtung unterscheidet sich von Ergebnissen, die mit kultivierten myenterischen Neuronen aus dem Dünndarm von Meerschweinchen erzielt wurden – hier konnte ein direkter Effekt von Compound 48/80 auf die kultivierten Neurone in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten nachgewiesen werden (Schemann et al. 2012). Wurden submuköse Neurone hingegen mit RBL-2H3-Zellen co-kultiviert, löste Compound 48/80 an beiden Zelltypen einen deutlichen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aus (die Reaktion co-kultivierter submuköser Neurone auf die Gabe von Compound 48/80 ist in den Abbildungen 3.17. B und 3.18. dargestellt.) Die deutliche Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration co-kultivierter submuköser Neurone durch Compound 48/80 spricht für die Wirkung von freigesetzten Mastzellmediatoren aus RBL-2H3-Zellen auf diese enterischen Nervenzellen. Die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von RBL-2H3-Zellen und Neuronen unterstützt diese Interpretation. Zunächst findet eine Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration in den RBL-2H3-Zellen statt, der Anstieg von Ca^{2+} in den co-kultivierten Neuronen folgt etwa 30 Sekunden später (Abbildung 3.19.).

Um zu überprüfen, welcher Anteil an der beobachteten Reaktion der Neurone durch den Mediator Histamin hervorgerufen wird, wurden funktionelle Experimente mit selektiven Histaminrezeptor-Antagonisten gegen die Histaminrezeptor-Subtypen H_1 , H_2 und H_3 durchgeführt. Der H_1 -Antagonist Pyrilamin und der H_2 -Antagonist Cimetidin hemmten die Reaktion der co-kultivierten submukösen Neurone auf Compound 48/80 signifikant. Durch die Vorinkubation mit Pyrilamin wurde die Anzahl der submukösen Neurone, welche nach der Gabe von Compound 48/80 eine Erhöhung der Fura-2-Ratio zeigten, radikal reduziert (die Responderquote wurde von etwa 90 % auf etwa 10 % gesenkt, siehe hierzu Kapitel 3.3.2.1., Abbildung 3.20. A). Die verbliebenen Responder zeigten außerdem einen signifikant niedrigeren Anstieg der Fura-2-Ratio (Abbildung 3.20. B).

4. Diskussion

Cimetidin hingegen konnte zwar die Anzahl der Responder nicht reduzieren, jedoch war auch hier eine signifikant verminderte Zunahme der gemessenen Fura-2-Ratio zu verzeichnen (Abbildung 3.20. A und B). Analog zu den Ergebnissen, welche mit denselben Rezeptorantagonisten bei der Untersuchung der Reaktion primär kultivierter Neurone auf Histamin erlangt wurden, war der H₃-Antagonist Thioperamid wirkungslos und der kombinierte Einsatz eines Gemischs aller drei Rezeptorantagonisten konnte zwar eine starke Hemmwirkung erzielen, diese war jedoch nicht größer als der Effekt, der durch den am stärksten wirksamen, einzeln eingesetzten Antagonisten, den H₁-Antagonisten Pyrilamin, beobachtet werden konnte (vergleiche Abbildung 3.20. A und B). Diese Daten zeigen, dass Histamin bei der Vermittlung von Effekten an co-kultivierten Neuronen durch Degranulation von RBL-2H3-Zellen eine große Rolle zukommt. Histamin wird im Allgemeinen als zentraler Mastzellmediator bezeichnet (Berin und Sampson 2013). Da jedoch keine vollständige Unterdrückung der Reaktion auf Compound 48/80 in den submukösen Neuronen erzielt werden konnte, müssen noch andere Mediatoren Ca²⁺-vermittelte Effekte hervorrufen.

Über die Wirkung von Mastzellproteasen auf submuköse Neurone aus dem Kolon der Ratte ist noch nichts bekannt. Da die Proteasen jedoch bei entzündlichen Erkrankungen eine große Rolle zu spielen scheinen, war es von Interesse ihren Anteil am durch Compound 48/80 vermittelten Anstieg von Ca²⁺ im Zytosol co-kultivierter submuköser Neurone zu überprüfen. Mastzellen spielen nicht nur bei der Pathogenese der Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I eine zentrale Rolle, sie sind auch wichtig für die Entstehung von entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. Multipler Sklerose oder Arthritis. Möglicherweise spielt die Wirkung von Proteasen hierbei eine wichtige Rolle. Sie zählen zu den präformierten Mastzellmediatoren und können somit von der Mastzelle mittels Degranulation freigesetzt werden. Sie wirken an speziellen Rezeptoren (protease-activated receptors = PAR), können aber auch Einfluss auf das Plasmaalbumin nehmen und histaminfreisetzende Peptide bilden (Carraway et al. 1989, Cochrane et al. 1993). Beides führt zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion (Theoharides et al. 2012).

Es sind vier verschiedene Subtypen von proteaseaktivierten Rezeptoren bekannt, sie werden als PAR₁ bis PAR₄ bezeichnet. Diese Rezeptoren sitzen in der Zellmembran und stellen, ebenso wie beispielsweise Histaminrezeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren dar. PAR₁, PAR₃ und PAR₄ werden dabei durch den Rezeptoragonisten Thrombin

4. Diskussion

aktiviert, PAR₂ reagiert auf Trypsin bzw. humane Mastzelltryptase (Vergnolle 2000). Bei der Rezeptoraktivierung durch Proteasen kommt es zu einer irreversiblen proteolytischen Spaltung des Rezeptors an seinem extrazellulären NH₂-Terminus – auf diesem Weg wird eine N-terminale Domäne freigelegt, die als bindender Ligand fungiert. Indem diese Sequenz an den Rezeptor selbst bindet, wird er aktiviert. Als Folge der Aktivierung kommt es zur Internalisierung des Rezeptors, welcher daraufhin Kurs auf die Lysosomen nimmt (Vergnolle 2000). Folge ist eine Desensitivierung. Zur Regeneration der Zelle auf proteaseinduzierte Antworten gehört entweder die Synthese von neuen PARs oder die Mobilisierung intrazellulärer Rezeptoren aus einem Reservoir präsynthetisierter Rezeptoren – für einige Zelltypen wie beispielsweise Enterozyten sind große intrazelluläre Pools im Golgi Apparat sowie in Vesikeln beschrieben (Hein et al. 1994, Böhm et al. 1996, Vergnolle 2000).

Submuköse Neurone aus dem Darm von Meerschweinchen scheinen besonders häufig den PAR₂-Rezeptor zu exprimieren, die Applikation von PAR₂-Agonisten führt zur Depolarisation der submukösen Neurone (Reed et al. 2003). Im Plexus myentericus des Meerschweinchens konnte die Expression von PAR₁- und PAR₂-Rezeptoren nachgewiesen werden (Corvera et al. 1999). Weitere Daten zur Rolle von PAR-Rezeptoren auf enterischen Neuronen wurden an kultivierten Neuronen des Menschen erhoben. Hier wurde sowohl im Plexus submucosus als auch im Plexus myentericus ein PAR-Rezeptor-vermittelter Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration beschrieben, der Großteil der Neurone scheint hier in beiden Plexus PAR₁-Rezeptoren zu tragen. Geringere (submuköser Plexus) bzw. keine Effekte (myenterischer Plexus) wurden über PAR₂-Rezeptoren vermittelt. Weiterhin konnten kleine Effekte als PAR₄-vermittelt identifiziert werden (Mueller et al. 2011, Kugler et al. 2012). Aufgrund der PAR₂-Dominanz, die in submukösen Neuronen des Meerschweinchens beschrieben wurde, und der PAR₁-Dominanz humaner submuköser Neurone wurde in meiner Arbeit die Rolle dieser beiden PAR-Rezeptor-Subtypen in submukösen Neuronen der Ratte untersucht. Die Inkubation mit dem PAR₁-Antagonisten FR 171113 sowie dem PAR₂-Antagonisten GB 83 vor der Zugabe von Compound 48/80 verminderte die Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in den co-kultivierten submukösen Neuronen signifikant (Abbildung 3.22. B). Auch die Anzahl der Zellen, die überhaupt auf Compound 48/80 reagierten, also die Anzahl der Responder, nahm in Gegenwart von GB83 signifikant ab (Abbildung 3.22. A).

4. Diskussion

Funktionell wurde die Expression von PAR-Rezeptoren auf submukösen Neuronen in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten nachgewiesen. Hierbei riefen PAR_1 - bzw. PAR_2 -Agonisten einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration hervor (Tabelle 3.5.).

Neben der Freisetzung präformierter Mastzellmediatoren, wie beispielsweise Histamin und Proteasen, kommt es durch die Aktivierung und Degranulation von Mastzellen auch zur De-novo-Synthese verschiedener Mediatoren, die direkt an die Umgebung abgegeben werden. Zu diesen zählen unter Anderem Lipidmediatoren wie die Arachidonsäuremetaboliten Prostaglandine und Leukotriene.

Prostaglandine werden im Allgemeinen beginnend mit der Abspaltung von Arachidonsäure aus Membranlipiden durch das Enzym Phospholipase A_2 (PLA_2) gebildet. Die Cyclooxygenase (COX, auch bezeichnet als Prostaglandin H Synthase = PGHS), die am endoplasmatischen Retikulum und an der Kernmembran lokalisiert ist, wandelt Arachidonsäure zu Prostaglandin H_2 (PGH_2) um. Es sind zwei Isoformen der COX bekannt. Im Allgemeinen ist die COX-1 für die basale, konstitutive Prostaglandinproduktion zuständig, die COX-2 spielt eine wichtige Rolle bei entzündlichen Vorgängen (Funk 2001). In Mastzellen kommt es durch die Prostaglandin D_2 Synthase zur Synthese von Prostaglandin D_2 (PGD_2) aus PGH_2 . (Funk 2001, Moon et al. 2010). PGD_2 verlässt die Zelle mithilfe des Prostaglandin Transporters (PGT) in der Zellmembran, einem Polypeptid aus der Familie der organischen Anionentransporter. Ein zusätzlicher Transport durch andere, bisher nicht charakterisierte, Transporter, wird diskutiert (Schuster 1998, Funk 2001). Die Wirkung von PGD_2 entfaltet sich durch Bindung an die G-Protein-gekoppelten Prostaglandinrezeptor-Subtypen DP_1 und DP_2 . DP_1 wird klassischerweise auf Lungenepithelzellen exprimiert. Es ist beschrieben, dass die Bindung von PGD_2 über Aktivierung des G_s -Proteins mit Anstieg von intrazellulärem cAMP zur Bildung des allergischen Asthmas beiträgt (Funk 2001). DP_2 , der auch als CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on $\text{T}_\text{H}2$ cells) bezeichnet wird, ist an ein G_i -Protein gekoppelt. Durch Bindung von PGD_2 kommt es zur Verminderung der intrazellulären cAMP Spiegel, weiterhin sind Ca^{2+} Mobilisierung sowie Bildung von DAG und IP_3 beschrieben (Kim und Luster 2007). Eine seiner Aufgaben besteht in der Vermittlung der Chemotaxis (Funk 2001).

4. Diskussion

Die Bildung von Leukotrienen startet ebenfalls mit der Abspaltung von Arachidonsäure durch die PLA₂. Diese wird dann durch 5-Lipoxygenase (LOX) unter Mithilfe von FLAP (5-lipoxygenase-activating protein), einem Protein in der Kernmembran, zu Leukotrien A₄ (LTA₄) umgewandelt (Funk 2001). In Mastzellen entsteht aus LTA₄ durch die Leukotrien C₄ Synthase das Produkt Leukotrien C₄ (LTC₄) (Funk 2001, Moon et al. 2010). Der Transport von LTC₄ aus der Mastzelle erfolgt über den membranständigen Transporter MRP1 (multidrug resistance-associated protein), außerhalb der Zelle kann durch die extrazellulär lokalisierte γ -glutamyl Transpeptidase (GGT) bzw. γ -glutamyl Leukotrienase (GGLT) eine Metabolisierung zu LTD₄ stattfinden. Beide Leukotriene wirken auf zwei Subtypen von Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptoren (CysLT₁ und CysLT₂), die beide G-Protein-gekoppelte Rezeptoren darstellen (Funk 2001). CysLT₁-Rezeptoren wurden auf glatten Muskelzellen der Atemwege sowie auf postkapillären venösen Endothelzellen nachgewiesen. LTD₄ kann hier über Bindung an CysLT₁ eine Bronchokonstriktion sowie Ödembildung hervorrufen. In verschiedenen Geweben, zum Beispiel Herz, Niere, aber auch auf verschiedenen Leukozyten, unter anderem Mastzellen, werden CysLT₂-Rezeptoren exprimiert. Sie können durch LTC₄ und LTD₄ aktiviert werden, die vermittelte Wirkung ist jedoch unklar. Es wird vermutet, dass CysLT₂, die auf Mastzellen lokalisiert sind, eine wichtige Rolle für die angeborene Immunität übernehmen, da sie hier die Produktion verschiedener Chemokine induzieren (Funk 2001, Kim und Luster 2007).

Um die Rolle der Eicosanoide an dem Effekt von Compound 48/80 auf co-kultivierte submuköse Neurone zu überprüfen, wurden die jeweiligen Synthesenzyme gezielt durch Hemmstoffe blockiert. Während die Blockade der COX wirkungslos blieb, konnte die Blockade der LOX die Reaktion auf Compound 48/80 maßgeblich reduzieren, indem sowohl die Responderquote als auch der Anstieg der Fura-2-Ratio vermindert wurden (Abbildung 3.21.). Die Unwirksamkeit der COX-Blockade lässt an der Expression von Rezeptoren für Prostaglandine auf submukösen Neuronen aus dem Kolon der Ratte zweifeln. Für submuköse Neurone aus dem Kolon von Meerschweinchen ist jedoch eine neuronale Depolarisation als Reaktion auf die Applikation von PGD₂ (Frieling et al. 1994b), PGF_{2 α} und PGI₂ (Frieling et al. 1995) beschrieben. Hinweise auf einen Effekt von LTD₄ auf submuköse Neurone aus dem Kolon der Ratte wurden bereits beschrieben (Rehn und Diener 2012), ein Nachweis der Expression von

4. Diskussion

Rezeptoren für Leukotriene liegt bei der Ratte bisher jedoch nur für Neurone des zentralen Nervensystems vor (Okubo et al. 2010). Vergleichbare Daten gibt es zu submukösen Neuronen aus dem Kolon des Meerschweinchens, LTC₄ löst an diesen Zellen eine Depolarisation der Membran aus (Frieling et al. 1997a).

In der Literatur ist die Kommunikation zwischen Mastzellen und Nervenzellen nicht nur in eine Richtung, also von Mastzelle zu Neuron mithilfe von parakrin wirkenden Mediatoren, sondern ebenfalls in die andere Richtung von Neuron zu Mastzelle durch Freisetzung von Neurotransmittern beschrieben (Buhner und Schemann 2012). In der Lamina propria der Mukosa des Darms sind die mukosalen Mastzellen in unmittelbarer Nähe zu extrinsischen afferenten Nervenendigungen bzw. zu enterischen Neuronen angeordnet (Schemann und Camilleri 2013). Bei 70 % der Mastzellen kommt es dabei sogar zu einem direkten Kontakt mit den Neuronen (Stead et al. 1989). Eine Studie mit Präparaten aus dem Darm von Meerschweinchen konnte beispielsweise durch Stimulation spinaler Afferenzen eine Freisetzung von Mastzellproteasen nachweisen. Diese konnten dann wiederum submuköse Neurone über PAR₁- und PAR₂-Rezeptoren aktivieren (Wang et al. 2009). Die Kommunikation von Nervensystem zu Immunsystem via Mastzellen im Darm ist wichtig, um die Homöostase in der Mukosa aufrecht zu erhalten und eine adäquate Antwort auf Verletzungen zu gewährleisten. Weiterhin sind Signalübertragungen von Nerv zu Mastzelle als Teile von Schleifen zum positiven Feedback beschrieben - durch die Mastzelldegranulation kommt es zur Freisetzung von Mediatoren, welche auf Neurone wirken. Daraufhin kommt es zur Ausschüttung von Neurotransmittern, die wiederum die Mastzellaktivität erhöhen können (De Winter et al. 2012). Um zu überprüfen, ob eine Beeinflussung von Mastzellen durch submuköse Neurone aus dem Kolon der Ratte stattfindet, wurden Versuche an dem Co-Kultur-Modell aus RBL-2H3-Zellen und submukösen Neuronen durchgeführt. Um eine Aktivierung der Nervenzellen zu erreichen, wurde KCl appliziert, die Neurone zeigten daraufhin erwartungsgemäß einen Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Der Fokus bei dieser Versuchsreihe lag jedoch auf der Reaktion der RBL-2H3-Zellen. Wie in Abbildung 3.23. deutlich zu sehen, konnte eine Aktivierung der co-kultivierten Neurone keine Veränderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration und damit auch keine Degranulation an den Mastzellen hervorrufen. Möglicherweise findet in kultivierten RBL-2H3-Zellen keine Kommunikation mit den primär kultivierten submukösen Neuronen der Ratte statt. Es könnte aller-

4. Diskussion

dings auch technische Probleme geben, die es unmöglich machten eine Kommunikation in diese Richtung nachzuweisen: Wenn der Abstand zwischen aktivierten Neuronen und RBL-2H3-Zellen zu groß ist, ist es für die freigesetzten Neurotransmitter nicht möglich an den RBL-2H3-Zellen zu wirken, da die Konzentrationen möglicherweise zu gering sind, um die Zellen zu erreichen.

4.3. Untersuchung von I_{sc} und passiver Permeabilität im Allergiemodell

Nach der Sensibilisierung der Ratten gegen Ovalbumin mit nachfolgender Verwendung der aus diesen Tieren hergestellten Submukosa-Mukosa-Präparaten in Ussingkammer-Experimenten, kommt es durch Applikation des Antigens – in diesem Fall Ovalbumin – zu einem Anstieg im Kurzschlussstrom. Dieser ist gleichbedeutend mit einer Sekretion von Chloridionen über die apikale Membran des Epithels (Hug et al. 1996). Versuche mit Mastzell-defizienten Mäusen (W/W^v), die gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden, zeigten einen im Vergleich zu Messungen an Kontrolltieren reduzierten Anstieg des I_{sc} nach Antigengabe (Perdue et al. 1991). Während die Antwort in den Kontrolltieren einen deutlichen Anstieg des I_{sc} zeigte, der durch Antagonisten gegen die Rezeptoren von Histamin, Serotonin und die Blockade der COX signifikant reduziert wurde, konnte die an den Mastzell-defizienten Mäusen verbleibende Restantwort nur durch COX-Blockade gehemmt werden. Eine intravenöse Injektion von Knochenmarkszellen der Kontrollmäuse führte zu einer den Kontrolltieren vergleichbaren Reaktion in den W/W^v Mäusen (Perdue et al. 1991). Diese Studie belegt eindrücklich, dass Mastzellen tatsächlich für die Vermittlung von antigeninduzierten Änderungen der Sekretion im Darm verantwortlich sind.

Diese Sekretion kommt durch einen Strom von Cl^- durch Chloridkanäle in der apikalen Membran zustande. Damit es zu einem Ausstrom von Cl^- kommt, sobald sich die Kanäle öffnen, muss eine elektrochemische Antriebskraft, also ein entsprechender Konzentrationsgradient und/oder ein Ladungsgradient, vorliegen. Diese entsteht in erster Instanz durch die basolateral lokalisierte $Na^+-K^+-ATPase$, eine Pumpe, die kontinuierlich zwei K^+ im Austausch gegen drei Na^+ in die Zelle transportiert. Da mehr positiv geladene Teilchen aus der Zelle heraus transportiert werden als in sie hinein und die aufgenom-

4. Diskussion

menen K^+ über basolaterale Kaliumkanäle rezirkulieren, ist das Zellinnere gegenüber seiner Umgebung negativ geladen. Der ebenfalls in der basolateralen Membran lokalisierte $Na^+-K^+-2Cl^-$ -Transporter, bei dem es sich um einen sekundär aktiven Cotransporter handelt, transportiert Cl^- gemeinsam mit K^+ und Na^+ in die Zelle. Na^+ kann die Zelle über die $Na^+-K^+-ATPase$ wieder verlassen, K^+ über Kaliumkanäle in der basolateralen Membran. Cl^- akkumuliert dagegen in der Zelle, bis es zur Öffnung apikaler Chloridkanäle kommt. Da sich die Chloridkonzentration aufgrund des negativen Membranpotentials über dem elektrochemischen Gleichgewicht befindet, kommt es zum Ausstrom von Cl^- . Um einen Ladungsausgleich zu gewährleisten, folgen Natriumionen parazellulär. Aus osmotischen Gründen folgt den sezernierten Ionen Wasser trans- oder parazellulär (Barrett und Keely 2000).

Die in meiner Studie durchgeführte Versuchsserie diente der Überprüfung der Beteiligung verschiedener Mastzellmediatoren an der durch Ovalbumin hervorgerufenen Chloridsekretion in Ussingkammer-Experimenten. Diese stellte sich in Submukosa-Mukosa-Präparaten des Kolons der sensibilisierten Ratten als steil ansteigender Peak im Kurzschlussstrom (I_{sc}) dar (Abbildung 3.24.). Da der Großteil der Resorption von Nahrungsbestandteilen und damit auch von potenziellen Nahrungsmittelallergenen im Dünndarm stattfindet (Faria et al. 2013), war es interessant nicht nur Submukosa-Mukosa-Präparate des Kolons zu untersuchen, sondern auch Jejunumsegmente aus denselben Tieren zu verwenden. Die Beteiligung von Histamin als zentralem Mastzellmediator wurde - nach der Untersuchung der Co-Kultur - ebenfalls im Allergiemodell mit sensibilisierten Ratten überprüft. Die Präinkubation mit einem selektiven Antagonisten gegen den H_1 -Rezeptor (Pyrilamin) konnte den Effekt von Ovalbumin in Submukosa-Mukosa-Präparaten aus dem Kolon der sensibilisierten Tiere signifikant reduzieren, ein H_2 -Rezeptorblocker (Cimetidin) war jedoch, trotz einer Verminderung der Peakhöhe des I_{sc} um etwa 20 %, statistisch gesehen wirkungslos. Ähnliche Ergebnisse konnten in Ussingkammer-Versuchen mit sensibilisierten Meerschweinchen erzielt werden. Im Kolon von Meerschweinchen, die mit *Trichinella spiralis* infiziert wurden, war die durch Antigengabe hervorgerufene Erhöhung des I_{sc} in Gegenwart des H_1 -Antagonisten Pyrilamin vermindert (Wang et al. 1991). Eine frühere Studie, die Kolonpräparate von sensibilisierten Meerschweinchen verwendete, konnte zeigen, dass die antigenvermittelte Erhöhung des I_{sc} durch den Einsatz von Pyrilamin in Kombination mit dem COX-Inhibitor Indometacin reduziert

4. Diskussion

wurde (Russel und Castro 1989). Beide Arbeiten konnten außerdem durch den Einsatz des Neurotoxins Tetrodotoxin eine neuronale Beteiligung an der Vermittlung der antigeninduzierten Effekte nachweisen. Weitere Studien, die mit Meerschweinchen, die gegen β -Lactoglobulin sensibilisiert wurden, durchgeführt wurden, beschäftigten sich mit dem Effekt, den die Antigengabe auf submuköse Neurone ausübt. Durch Applikation des Antigens kam es zur Depolarisation des Membranpotentials und einer erhöhten Erregbarkeit in submukösen Neuronen aus dem Kolon (Frieling et al. 1994a) bzw. Jejunum (Liu et al. 2003), hier war der Effekt jedoch H_2 -vermittelt. Versuche mit Ratten, die mit *Fasciola hepatica* infiziert wurden, zeigten ebenfalls eine antigeninduzierte, Tetrodotoxin-sensitive (also neuronal vermittelte) Erhöhung des I_{sc} . Interessanterweise war die Präinkubation mit dem H_1 -Antagonisten Pyrilamin in dieser Studie ohne Effekt (O'Malley et al. 1993).

Ebenso wie durch den H_1 -Antagonisten Pyrilamin konnte auch durch die Antagonisten der Proteaserezeptoren PAR_1 (FR 171113) und PAR_2 (GB 83) und durch die Blockade der LOX, des für die Synthese von Leukotrienen verantwortlichen Enzyms, mittels BW A4C eine signifikante Reduktion des antigeninduzierten Anstiegs im I_{sc} im Kolon erzielt werden (Abbildung 3.25. sowie Tabelle 3.6.). Eine Blockade der COX mit Indometacin wurde nicht durchgeführt, da dieser Hemmstoff im Co-Kultur-Modell keine Rolle spielte (siehe 3.3.2.2.). In der Studie von Hug et al., in der ebenfalls mit Kolonpräparaten aus Ratten, die gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden, gearbeitet wurde, war der antigeninduzierte Anstieg des I_{sc} Indometacin-sensitiv (Hug et al. 1996). O'Malley zeigte 1993 an Präparaten von Ratten, die mit *Fasciola hepatica* infiziert wurden, ebenfalls eine Abhängigkeit des antigeninduzierten Anstiegs des I_{sc} von Prostaglandinen (O'Malley et al. 1993). Zur Beteiligung von Proteasen am antigeninduzierten Anstieg des I_{sc} gibt es bisher in der Literatur kaum Daten. In Experimenten mit Mäusen, die mit *Nippostrongylus brasiliensis* oder *Heligmosomoides polygyrus* infiziert wurden, konnte jedoch eine Verminderung der Chloridsekretion, die durch die Aktivierung des PAR_2 -Rezeptors mittels PAR_2 -Agonisten hervorgerufen wurde, nachgewiesen werden (Shea-Donohue et al. 2010). Die Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* führte weiterhin zu einer erhöhten Kontraktilität, die sowohl PAR_1 - (Zhao et al. 2005) als auch PAR_2 -vermittelt war (Shea-Donohue et al. 2010), und zu einer Hochregulation der Rezeptoren PAR_1 (Zhao et al. 2005) und PAR_2 (Shea-Donohue et al. 2010) im Darm der untersuchten Mäuse. Auch

4. Diskussion

über die Beteiligung von Leukotrienen ist bisher nur wenig bekannt. Versuche mit Kolonpräparaten von Mäusen, die mit *Trichinella spiralis* infiziert wurden, konnten jedoch eine Beteiligung von Prostaglandinen und Leukotrienen an der antigeninduzierten Chloridsekretion nachweisen. Die Antwort auf die Applikation des Antigens war hier jedoch weder neuronal vermittelt noch spielte der H_1 -Rezeptor eine Rolle (Tetrodotoxin und Pyrilamin waren beide unwirksam) (Broaddus und Castro 1994). In derselben Studie wurden auch Mastzell-defiziente Mäuse (W/W^v) eingesetzt – eine Konfrontation mit dem Antigen konnte hier bei Präparaten, die aus sensibilisierten Tieren gewonnen wurden, keine Antwort auslösen (Broaddus und Castro 1994). Bei Meerschweinchen gibt es zwar noch keine Daten zur Beteiligung von Leukotrienen im Allergiemodell, es ist jedoch bekannt, dass es durch LTC_4 und LTD_4 zu einer Erhöhung des I_{sc} am Kolon kommt (Hammerbeck und Brown 1993), bei Langzeit-Applikation kann eine zyklische Chloridsekretion beobachtet werden (Frieling et al. 1997a). Gleiches gilt für die Prostaglandine PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 und PGI_2 (Frieling et al. 1997b). Die Wirkung der genannten Prostaglandine und von LTC_4 ist neuronal vermittelt, eine Aktivierung von submukösen Neuronen des Meerschweinchens durch die vier untersuchten Prostaglandine und LTC_4 konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Frieling 1997b). Hier scheinen aber deutliche Speziesunterschiede zu bestehen, denn bei der Ratte wirkt PGD_2 im Unterschied zu den anderen Prostaglandinen antisekretorisch (Goerg et al. 1991).

Die Versuche mit Jejunumsegmenten der sensibilisierten Tiere zeigten eine vergleichbare Reaktion auf die Gabe von Ovalbumin wie die Kolonpräparate. Insgesamt waren die Effekte jedoch inhomogener und im Mittel geringer als bei den Submukosa-Mukosa-Präparaten aus dem Kolon, sodass die Streuung der erfassten Daten sehr groß war und in den Blockerexperimenten keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Vergleichbare Ergebnisse konnten in Versuchen mit Meerschweinchen, die mit *Trichinella spiralis* infiziert wurden, erzielt werden. Die Verabreichung des Antigens in Ussingkammer-Experimenten führte sowohl an Jejunum- als auch an Kolonsegmenten zu einem Anstieg des I_{sc} . Die antigeninduzierte Zunahme des I_{sc} am Kolon war jedoch deutlich größer (Russel 1986, Russel und Castro 1989). Die Messung der antigeninduzierten Histaminfreisetzung zeigte jedoch eine etwa fünffach höhere Ausschüttung im Jejunum als im Kolon. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass das Jejunum aufgrund der größe-

4. Diskussion

ren Exposition gegenüber Histamin in vivo durch Desensitivierung der Histaminrezeptoren weniger empfindlich reagiert (Russel und Castro 1989).

Die Versuche mit den verschiedenen Antagonisten gegen die Rezeptoren der Mediatoren Histamin und Proteasen bzw. mit der Blockade der LOX konnten den Anstieg des I_{sc} über die Baseline alle etwa zwischen 30 und 60 % reduzieren, aufgrund der großen Streuung und geringen Gruppengröße erreichten diese Effekte jedoch geschlossen keine Signifikanz (Abbildung 3.27. sowie Tabelle 3.7.).

Neben der Messung des Kurzschlussstroms in Ussingkammern wurde die Veränderung der parazellulären Permeabilität für die Dauer der Ussingkammer-Messungen anhand des Fluxes der passiv transportierten niedermolekularen Markersubstanz Fluorescein bestimmt. Die Verwendung von Fluorescein als Marker für die parazelluläre Transportrate wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (siehe z.B. Krug et al. 2009, Rosenthal et al. 2010).

Die Struktur der Zell-Zell-Kontakte im Darm ist segmental sehr unterschiedlich ausgeprägt. Während das Kolon ein mitteldichtes Epithel darstellt („moderately tight“), zählt das Jejunum zu den lecken („leaky“) Epithelien. Dieser Unterschied korreliert mit der unterschiedlichen Expressierung verschiedener Claudine (Markov et al. 2010). Bei Claudinen handelt es sich, gemeinsam mit dem Occludin, um die wichtigsten bekannten Membranproteine der Tight Junctions (Kinugasa et al. 2000). Die multigene Claudin-Familie besteht aus mindestens 15 verschiedenen Claudinen. Tight Junctions stellen spezialisierte Membrandomänen an den apikalen Regionen von polarisierten Epithelzellen dar. Sie limitieren nicht nur den parazellulären Transport von Flüssigkeiten und Elektrolyten, es kommt auch zur Unterdrückung der Diffusion von Lipiden und Proteinen zwischen apikaler und basolateraler Membran, um die Polarisierung der Epithelzelle aufrecht zu erhalten. Es handelt sich um makromolekulare Zusammenschlüsse von Proteinen in Form von Ringen um den apikalen Zellpol (Kinugasa et al. 2000). Es ist beschrieben, dass es durch die Degranulation von Mastzellen zur Beeinflussung der epithelialen Barriere und damit zur Erhöhung der parazellulären Permeabilität kommt (Yu 2012). Eine erhöhte intestinale Permeabilität führt zu einer gesteigerten Exposition gegenüber Nahrungsmittelallergenen und kann sowohl die Sensibilisierung gegen diese als auch den Schweregrad von allergischen Reaktionen erhöhen (Groschwitz und Hogan

4. Diskussion

2009). Die Auswirkung des Eingriffs in einen anderen Teil der physiologischen Barriere des Magen-Darm-Traktes, die Produktion der Magensäure, konnte im Mausmodell verdeutlicht werden. Hier führte die Verabreichung von Antazida, die eine erniedrigte Azidität des Magens herbeiführen, zu einem höheren Grad an IgE-Bildung infolge Sensibilisierung (Untersmayr und Jensen-Jarolim 2008). Den Epithelzellen im Darm kommt dabei eine regulatorische Funktion zu. Die intestinale Aufnahme von gelösten Antigenen verläuft in zwei aufeinanderfolgenden Phasen (Berin et al. 1997). Zunächst kommt es zum transepithelialen Transport durch Endosomen, dieser Transport ist noch unabhängig von Mastzellen (Berin et al. 1998), allerdings antigenspezifisch. In sensibilisierten Ratten läuft er zehnmal schneller ab als in nicht sensibilisierten Kontrolltieren. Die zweite Phase der Antigenaufnahme erfolgt parazellulär, sie ist abhängig von Mastzellen, allerdings unabhängig vom Antigen. Dieser Transport ist in sensibilisierten Tieren signifikant erhöht (Berin et al. 1997). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass während des Ablaufs von IgE-vermittelten Reaktionen im Gastrointestinaltrakt sowohl die Rate der Antigenaufnahme als auch die aufgenommene Gesamtmenge an Antigen signifikant erhöht sind (Sampson 1999a), was für eine deutliche Barrierestörung, die im Sinne eines *circulus vitiosus* die Krankheit weiter unterhält, spricht.

Versuche mit dem Jejunum von Ratten, die gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden, deuten eine neuronale Beteiligung an der Regulation der intestinalen Permeabilität an. Antigengabe führte zu einer sekretorischen Antwort, die durch Tetrodotoxin vermindert werden konnte (Crowe et al. 1990). Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Tight Junctions in den verschiedenen Darmabschnitten stellte sich auch die Frage, ob sich die Beeinflussung der parazellulären Permeabilität durch Antigengabe, sofern nachweisbar, im Kolon anders darstellt als im Jejunum.

Die Fluxrate für Fluorescein in Submukosa-Mukosa-Präparaten des Kolons sensibilisierter Ratten veränderte sich nach Applikation von Ovalbumin (dies entspricht der Gabe des Antigens) nicht (Abbildung 3.26.). In den Jejunumsegmenten konnte nach der Zugabe des Antigens jedoch eine langsame Zunahme des parazellulären Fluorescein-Fluxes von mukosal nach serosal nachgewiesen werden (Abbildung 3.28.). Da während der gesamten Versuchsserie an gegen Ovalbumin sensibilisierten Ratten Fluxe bestimmt wurden, konnte ausgewertet werden, ob die Präinkubation mit einem Antagonisten gegen die Histaminrezeptor-Subtypen H₁ oder H₂, einem Antagonisten gegen die

4. Diskussion

Proteaserezeptoren PAR₁ oder PAR₂ oder die Blockade der LOX zu einer Reduktion des beobachteten Anstiegs der Fluxrate in Jejunumsegmenten sensibilisierter Ratten nach Zugabe des Antigens führte. Nach Inkubation mit den Antagonisten der Histaminrezeptoren, Pyrilamin und Cimetidin, ebenso wie nach Blockade der PAR₂-Rezeptoren und der LOX war der beobachtete Anstieg der Fluxrate nach Antigenapplikation vermindert – es handelte sich jedoch ausschließlich um einen Trend, der keine statistische Signifikanz erreichte. Die Hemmung der PAR₁-Rezeptoren rief keine Veränderung in der Fluxrate hervor (für die genauen Daten siehe Tabelle 3.8.).

Vermutlich konnten durch den unterschiedlich dichten Aufbau der Epithelien in Dün- und Dickdarm nur im Jejunum der sensibilisierten Ratten Veränderungen der intestinalen Permeabilität durch Zugabe von Antigen nachgewiesen werden. Möglicherweise lässt sich die fehlende Modulation der intestinalen Permeabilität im Kolon mit der ohnehin geringen Resorptionsrate im Kolon erklären. Da der absolut größte Anteil der aufgenommenen Nahrung im Dünndarm gespalten und aufgenommen wird (Faria et al. 2013), findet auch hier die größte Antigenexposition im Epithel statt und es kommt in viel größerem Maße zur Aktivierung von Mastzellen durch Cross-linking der IgE-Rezeptoren bei Bindung des Antigens an IgE-Antikörper (eine genaue Erläuterung der Mechanismen findet sich in Kapitel 1.3.).

4.4. Fazit

Nahrungsmittelallergien haben gerade in den industrialisierten Ländern eine zunehmend große Bedeutung. Sie sind ein sehr gutes Beispiel für die enge Verzahnung von enterischem Nervensystem und Immunsystem. Verschiedene Studien konnten belegen, dass es durch die Aufnahme des Antigens, gegen welches die Allergie besteht, zu einer Aktivierung und damit zur Degranulation von Mastzellen kommt. Durch die Degranulation werden verschiedene Mediatoren aus den Mastzellen freigesetzt, dabei handelt es sich unter anderem um Histamin und Proteasen. Des Weiteren kommt es durch die Aktivierung zur Synthese verschiedener Mediatoren, wie zum Beispiel den Arachidonsäuremetaboliten Prostaglandine und Leukotriene (Funk 2001). Die Mastzellmediatoren lösen eine vermehrte Sekretion von Elektrolyten und Wasser durch das Darmepithel aus (Russel und Castro 1989, Barrett und Keely 2000). Es entsteht das klinische Bild einer

4. Diskussion

sekretorischen Diarrhoe. An der glatten Muskulatur des Darms werden starke Kontraktionen ausgelöst (Barnette und Grous 1992). Weiterhin werden die Gefäße im Darm dilatiert, der Blutfluss wird gesteigert (Wood 1991). Diese Veränderungen bewirken die schnelle Eliminierung der Allergene aus dem Darmlumen und dienen damit dem Schutz. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die Vermittlung der Effekte durch Mastzellmediatoren eine neuronale Beteiligung beinhaltet (Wood 1991, Buhner und Schemann 2012). Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktion enterischer Neurone aus dem Plexus submucosus der Ratte auf verschiedene Mastzellmediatoren, in erster Linie Histamin, aufzuklären. Die Etablierung einer Co-Kultur bestehend aus submukösen Neuronen sowie einem Mastzelläquivalent ergab neue Aufschlüsse über die Wirkung verschiedener Mastzellmediatoren an enterischen Neuronen. Die Ergebnisse, die mithilfe der Co-Kultur generiert wurden, konnten im Allergiemodell mit Ratten, die gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden, bis auf eine Ausnahme (H_2 -vermittelter Effekt des Antigens in Submukosa-Mukosa-Präparaten des Kolons von sensibilisierten Ratten nicht signifikant), bestätigt werden. Der wichtigste Mediator bei allergischen Reaktionen im Intestinaltrakt ist Histamin – es wirkt über Rezeptoren der Subtypen H_1 und H_2 , geringgradig auch H_3 , direkt an submukösen Neuronen der Ratte (Abbildung 4.1.). Proteasen haben ebenfalls einen Anteil an der Reaktion, die durch die Degranulation von Mastzellen hervorgerufen wird. Wichtig sind außerdem de novo synthetisierte Leukotriene. Nach wie vor sind noch viele Fragen bezüglich der Kommunikation zwischen enterischen Neuronen und Mastzellen offen. Die neu entwickelte Co-Kultur scheint ein probates Hilfsmittel zu sein, um diesen Fragestellungen in vitro nachzugehen.

4. Diskussion

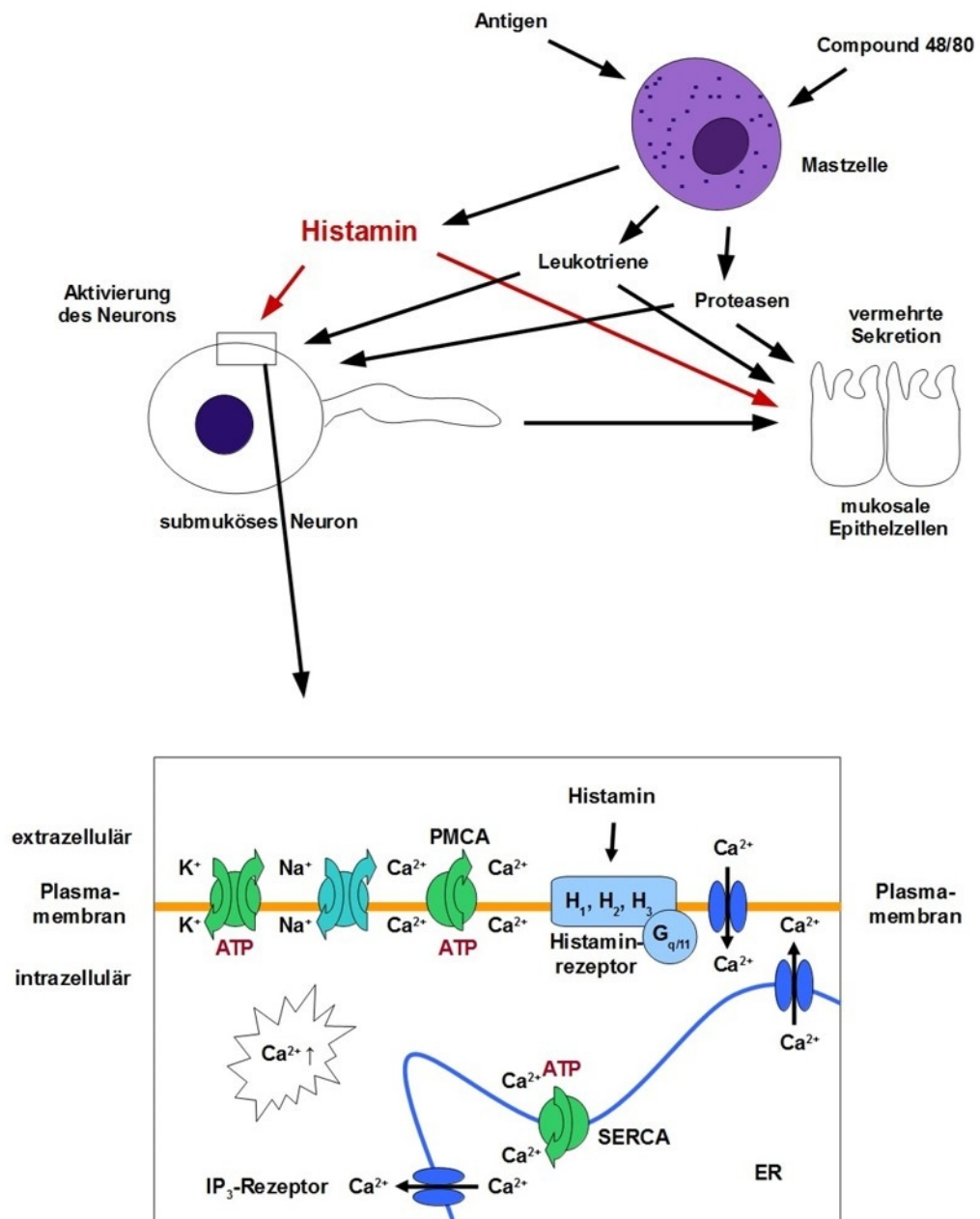


Abbildung 4.1. Zusammenfassende Darstellung des Zusammenspiels zwischen Mastzellen, submukösen Neuronen und mukosalen Epithelzellen sowie der Wirkung von Histamin auf submuköse Neurone. PMCA = Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase; ER = endoplasmatisches Retikulum; SERCA = sarkoendoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase.

5. Zusammenfassung

Histamin ist ein Mastzellmediator, der bei einer Vielzahl pathophysiologischer Zustände eine Rolle spielt, unter Anderem bei der Nahrungsmittelallergie.

Das erste Ziel meines Projekts waren die Charakterisierung des Effektes von Histamin auf submuköse Neurone der Ratte und die Identifizierung der beteiligten Mechanismen. RT-PCR, bestätigt durch immunzytochemische Markierungen, zeigte die Expression der Histaminrezeptoren H_1 , H_2 und H_3 auf submukösen Neuronen des Kolons der Ratte. Histamin ruft einen biphasischen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in diesen Neuronen hervor – hierbei kommt es zunächst zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern via IP_3 -Rezeptoren gefolgt von einem Einstrom aus dem Extrazellulärraum. Obwohl Agonisten aller drei Rezeptorsubtypen einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auslösen konnten, zeigten Experimente mit selektiven Antagonisten, dass die Antwort auf Histamin vorwiegend durch H_1 (und zu einem geringeren Anteil durch H_2) vermittelt wird.

Da Histamin und andere Mediatoren durch die Degranulation von Mastzellen freigesetzt werden, war das zweite Ziel der Arbeit die Untersuchung des Zusammenspiels zwischen submukösen Neuronen der Ratte und Mastzellen. In Co-Kultur-Experimenten mit RBL-2H3-Zellen, einem Mastzelläquivalent, konnte der Mastzelldegranulator Compound 48/80 einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in benachbarten submukösen Neuronen auslösen. Wie schon die Antwort auf Histamin, wurde auch der Effekt von Compound 48/80 durch den H_1 -Antagonisten Pyrilamin stark gehemmt und durch den H_2 -Antagonisten Cimetidin reduziert. Eine Beteiligung von proteaseaktivierten Rezeptoren (PAR_1 und PAR_2) sowie 5-Lipoxygenase an der Reaktion wurde ebenfalls nachgewiesen.

Abschließend diente ein Allergiemodell mit Ratten, die gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden, der Untersuchung des Effektes von Antigen auf den Kurzschlussstrom (I_{sc}) und die parazelluläre Permeabilität. Ovalbumin induzierte einen Anstieg des I_{sc} , der mit einem Anstieg des parazellulären Fluorescein-Fluxes im Jejunum (jedoch nicht im Kolon) einherging. Pyrilamin hemmte den Anstieg des I_{sc} im Kolon stark, Antagonisten von PAR_1 und PAR_2 sowie die Blockade von 5-Lipoxygenase konnten den Anstieg ebenfalls reduzieren.

5. Zusammenfassung

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse eine Expression von H_1 -, H_2 - und H_3 -Rezeptoren auf submukösen Neurone der Ratte, wobei H_1 -Rezeptoren die größte funktionelle Bedeutung zukommt. Das Modell der Co-Kultur aus submukösen Neuronen und RBL-2H3-Zellen stellt eine geeignete Möglichkeit zur weiteren Untersuchung der Kommunikation beider Zelltypen dar.

6. Summary

Histamine is a mast cell mediator involved in a variety of pathophysiologic conditions, e.g. food allergy.

The first aim of my project was to characterize the effect of histamine on rat submucosal neurons and the mechanisms involved. Cultured submucosal neurons from rat colon express H₁, H₂, and H₃ receptors as shown by RT-PCR confirmed by immunocytochemical stainings. Histamine evoked a biphasic rise of the cytosolic Ca²⁺ concentration in these neurons, which consisted of a release of intracellularly stored Ca²⁺ via IP₃ receptors followed by an influx from the extracellular space. Although agonists of all three receptor subtypes evoked an increase in the cytosolic Ca²⁺ concentration, experiments with antagonists revealed that mainly H₁ (and to a lesser degree H₂) receptors mediate the response to histamine.

As mast cell degranulation leads to release of histamine and other mediators, the investigation of the interaction between rat submucosal neurons and mast cells was the second aim of the study. In coculture experiments with RBL-2H3-cells, a mast cell equivalent, the mast cell degranulator compound 48/80 evoked an increase in the cytosolic Ca²⁺ concentration of neighbouring neurons. Like the response to native histamine, the neuronal response to compound 48/80 was strongly inhibited by the H₁ receptor antagonist pyrilamine and reduced by the H₂ receptor antagonist cimetidine. But also protease activated receptors (PAR₁ and PAR₂) and 5-lipoxygenase took part in the neuronal response to mast cell degranulation.

Finally, the use of an allergy model with rats sensitized against ovalbumin allowed the monitoring of short-circuit current (I_{sc}) and paracellular permeability in response to the antigen. Exposure to ovalbumin induced a rise in I_{sc}, which was concomitant with an increase in the paracellular flux in the small intestine (but not in the colon). Pylamine strongly inhibited the increase in I_{sc} across the colon, a weaker inhibition was observed after blockade of protease receptors PAR₁ and PAR₂ or 5-lipoxygenase.

Summing up, while rat submucosal neurons express the histamine receptors H₁, H₂ and H₃, H₁ receptors seem to play a pivotal role in the interaction between mast cells and the enteric nervous system. The coculture model of submucosal neurons and RBL-2H3 cells appears to be a suitable option for further investigation of their communication.

7. Literaturverzeichnis

- Abraham SN, St John AL 2010.** Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 10:440-452
- Andres H, Rock R, Bridges RJ, Rummel W, Schreiner J 1985.** Submucosal plexus and electrolyte transport across rat colonic mucosa. *J Physiol* 364:301-312
- Auerbach L 1864.** Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Virchows Arch path Anat Physiol* 30:457-460
- Baram D, Mekori YA, Sagi-Eisenberg R 2001.** Synaptotagmin regulates mast cell functions. *Immunol Rev* 179:25-34
- Barnette MS, Grous M 1992.** Characterization of the antigen-induced contraction of colonic smooth muscle from sensitized guinea pigs. *Am J Physiol* 262:G144-149
- Barrett KE, Keely SJ 2000.** Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62:535-572
- Barry GD, Suen JY, Le GT, Cotterell A, Reid RC, Fairlie DP 2010.** Novel agonists and antagonists for human protease activated receptor 2. *J Med Chem* 53:7428-7440
- Barsumian EL, Isersky C, Petrino MG, Siraganian RP 1981.** IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur J Immunol* 11:317-323
- Bayliss WM, Starling EH 1899.** The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol* 24:99-143
- Bell A, Althaus M, Diener M 2014.** Communication between mast cells and rat submucosal neurons. *Pflugers Arch* doi:10.1007/s00424-014-1609-9
- Bennett A, Whitney B 1966.** A pharmacological study of the motility of the human gastrointestinal tract. *Gut* 7:307-316
- Berin MC, Kiliaan AJ, Yang PC, Groot JA, Kitamura Y, Perdue MH 1998.** The influence of mast cells on pathways of transepithelial antigen transport in rat intestine. *J Immunol* 161:2561-2566
- Berin MC, Kiliaan AJ, Yang PC, Groot JA, Taminiau JA, Perdue MH 1997.** Rapid transepithelial antigen transport in rat jejunum: impact of sensitization and the hypersensitivity reaction. *Gastroenterology* 113:856-864
- Berin MC, Sampson HA 2013.** Food allergy: an enigmatic epidemic. *Trends Immunol* 34:390-397
- Berridge MJ 1992.** Phosphoinositides and cell signalling. *Fidia Research Foundation Neuroscience Research Award Lectures* 6:5-45 Raven Press, New York
- Bilmen JG, Michelangeli F 2002.** Inhibition of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by 2-aminoethoxydiphenylborate. *Cell Signal* 14:955-960
- Bischoff S, Crowe SE 2005.** Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. *Gastroenterology* 128:1089-1113
- Bischoff SC 2009.** Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol* 31:185-205

7. Literaturverzeichnis

- Blaustein MP, Lederer WJ 1999.** Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79:763-854
- Böhm SK, Khitin LM, Grady EF, Aponte G, Payan DG, Bunnett NW 1996.** Mechanisms of Desensitization and Resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* 271:22003-22016
- Bornstein JC, Furness JB 1988.** Correlated electrophysiological and histochemical studies of submucous neurons and their contribution to understanding enteric neural circuits. *J Auton Nerv Syst* 25:1-13
- Brelje TC, Wessendorf MW, Sorenson RL 2002.** Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations. *Methods Cell Biol* 70:165-244
- Bresson JL, Pang KY, Walker WA 1984.** Microvillus membrane differentiation: quantitative difference in cholera toxin binding to the intestinal surface of newborn and adult rabbits. *Pediatr Res* 18:984-987
- Breunig E 2006.** Die Wirkung von Histamin auf die Nervenaktivität im humanen Plexus submucosus. Dissertationsschrift, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München
- Breunig E, Michel K, Zeller F, Seidl S, Weyhern CW, Schemann M 2007.** Histamine excites neurones in the human submucous plexus through activation of H1, H2, H3 and H4 receptors. *J Physiol* 583:731-742
- Broaddus RR, Castro GA 1994.** Mast cell-mediated colonic immune function and its inhibition by dietary aspirin in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Int Arch Allergy Immunol* 105:135-142
- Buhner S, Schemann M 2012.** Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut. *Biochim Biophys Acta* 1822:85-92
- Burgio GR, Lanzavecchia A, Plebani A, Jayakar S, Ugazio AG 1980.** Ontogeny of secretory immunity: levels of secretory IgA and natural antibodies in saliva. *Pediatr Res* 14:1111-1114
- Bygrave FL 1978.** Mitochondria and the control of intracellular calcium. *Biol Rev Camb Philos Soc* 53:43-79
- Cao J, Papadopoulou N, Kempuraj D, Boucher WS, Sugimoto K, Cetrulo CL, Theoharides TC 2005.** Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 174:7665-7675
- Carraway RE, Cochrane DE, Boucher W, Mitra SP 1989.** Structures of histamine-releasing peptides formed by the action of acid proteases on mammalian albumin(s). *J Immunol* 143:1680-1684
- Catterall WA 1980.** Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:15-43
- Chehade M, Mayer L 2005.** Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 115:3-12

7. Literaturverzeichnis

- Chen CC, Grimaldeston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ 2005.** Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11408-11413
- Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL 1995.** Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376:177-180
- Claro E, Garcia A, Picatoste F 1989.** Carbachol and histamine stimulation of guanine-nucleotide-dependent phosphoinositide hydrolysis in rat brain cortical membranes. *Biochem J* 261:29-35
- Cochrane DE, Carraway RE, Feldberg RS, Boucher W, Gelfand JM 1993.** Stimulated rat mast cells generate histamine-releasing peptide from albumin. *Peptides* 14:117-123
- Cooke HJ 1989.** Role of the „little brain“ in the gut in water and electrolyte homeostasis. *FASEB J* 3:127-138
- Coons AH 1958.** Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1:399-422
- Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Gamp P, Thoma M, Al-Ani B, Caughey GH, Hollenberg MD, Bunnett NW 1999.** Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. *J Physiol* 517:741-756
- Cox HM, Cuthbert AW 1988.** Neuropeptide Y antagonises secretagogue evoked chloride transport in rat jejunal epithelium. *Pflugers Arch* 413:38-42
- Crowe SE, Sestini P, Perdue MH 1990.** Allergic reactions of rat jejunal mucosa. Ion transport responses to luminal antigen and inflammatory mediators. *Gastroenterology* 99:74-82
- Dalal I, Binson I, Reifen R, Amitai Z, Shohat T, Rahmani S, Levine A, Ballin A, Somekh E 2002.** Food allergy is a matter of geography after all: sesame as a major cause of severe IgE-mediated food allergic reactions among infants and young children in Israel. *Allergy* 57:362-365
- De Winter BY, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ 2012.** Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochim Biophys Acta* 1822:66-73
- Diener M, Mestres P, Bridges RJ, Rummel W 1989.** Functional and morphological changes during electric field stimulation of rat colon descendens. In: Nerves and the Gastrointestinal Tract. Herausgeber: Singer MV, Goebell H im MTP Press, Lancaster Boston The Hague Dordrecht, 705-712
- Dogiel AS 1899.** Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch Anat Physiol Leipzig, Anat Abt* 130-158
- Donaldson J, Brown AM, Hill SJ 1989.** Temporal changes in the calcium-dependence of the histamine H1-receptor-stimulation of cyclic AMP accumulation in guinea-pig cerebral cortex. *Br J Pharmacol* 98:1365-1375
- Du Toit G, Katz Y, Sasieni P, Mesher D, Maleki SJ, Fisher HR, Fox AT, Turcanu V, Amir T, Zadik-Mnuhin G, Cohen A, Livne I, Lack G 2008.** Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 122:984-991

7. Literaturverzeichnis

- Dvorak AM, McLeod RS, Onderdonk A, Monahan-Earley RA, Cullen JB, Antonioli DA, Morgan E, Blair JE, Estrella P, Cisneros RL 1992.** Ultrastructural evidence for piecemeal and anaphylactic degranulation of human gut mucosal mast cells in vivo. *Int Arch Allergy Immunol* 99:74-83
- Eigenmann PA, Frossard CP 2003.** The T lymphocyte in food-allergy disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3:199-203
- Enerbäck L, Svensson I 1980.** Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of Percoll. *J Immunol Methods* 39:135-145
- Faria AM, Gomes-Santos AC, Gonçalves JL, Moreira TG, Medeiros SR, Dourado LP, Cara DC 2013.** Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. *Front Immunol* 4:Article 102
- Fergusson DM, Horwood LJ, Shannon FT 1990.** Early solid feeding and recurrent childhood eczema: a 10-year longitudinal study. *Pediatrics* 86:541-546
- Fischer MJ, Paulussen JJ, Horbach DA, Roelofsen EP, van Miltenburg JC, de Mol NJ, Janssen LH 1995.** Inhibition of mediator release in RBL-2H3 cells by some H1-antagonist derived anti-allergic drugs: relation to lipophilicity and membrane effects. *Inflamm Res* 44:92-97
- Frieling T, Becker K, Rupprecht C, Dobрева G, Häussinger D, Schemann M 1997a.** Leukotriene-evoked cyclic chloride secretion is mediated by enteric neuronal modulation in guinea-pig colon. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355:625-630
- Frieling T, Cooke HJ, Wood JD 1993.** Histamine receptors on submucous neurons in guinea pig colon. *Am J Physiol* 264:G74-80
- Frieling T, Cooke HJ, Wood JD 1994a.** Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after sensitization to milk antigen. *Am J Physiol* 267:G1087-1093
- Frieling T, Rupprecht C, Dobрева G, Häussinger D, Schemann M 1995.** Effects of prostaglandin F2 alpha (PGF2 alpha) and prostaglandin I2 (PGI2) on nerve-mediated secretion in guinea-pig colon. *Pflügers Arch* 431:212-220
- Frieling T, Rupprecht C, Dobрева G, Schemann M 1997b.** Differential effects of inflammatory mediators on ion secretion in the guinea-pig colon. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 118:341-343
- Frieling T, Rupprecht C, Kroese AB, Schemann M 1994b.** Effects of the inflammatory mediator prostaglandin D2 on submucosal neurons and secretion in guinea pig colon. *Am J Physiol* 266:G132-139
- Funk CD 2001.** Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871-1875
- Furness JB 2006.** The Enteric Nervous System. First Edition, Blackwell Publishing, Oxford.
- Furness JB, Costa M 1980.** Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5:1-20

7. Literaturverzeichnis

- Galli SJ, Nakae S, Tsai M 2005.** Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:135-142
- Galli SJ, Tsai M 2010.** Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 40:1843-1851
- Goerg KJ, Diener C, Diener M, Rummel W 1991.** Antisecretory action of prostaglandin D2 in rat colon in vitro: action sites. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 260:G904-910
- Göthert M, Schlicker E 2001.** Pharmakologie des Histamins. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Herausgeber: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K in Urban & Fischer Verlag, München, 231-240
- Groschwitz KR, Hogan SP 2009.** Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 124:3-20
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG 1996.** Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 184: 19-29
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY 1985.** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450
- Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O 2008.** Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* 88:1183-1241
- Hallam TJ, Jacob R, Merritt JE 1988.** Evidence that agonists stimulate bivalent-cation influx into human endothelial cells. *Biochem J* 255:179-184
- Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Kiyono H, Yamamoto H, Ishikawa H 2002.** Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 168:57-64
- Hammerbeck DM, Brown DR 1993.** Neurally mediated actions of leukotrienes on ion transport in guinea pig distal colon. *J Pharmacol Exp Ther* 264:384-390
- Hansen MB 2003a.** The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol Toxicol* 92:105-113
- Hansen MB 2003b.** The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacol Toxicol* 92:249-257
- Hardcastle J, Hardcastle PT 1987.** The secretory actions of histamine in rat small intestine. *J Physiol* 388:521-532
- Harlow E, Lane D 1988.** Antibodies – a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Harr MW, Distelhorst CW 2010.** Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a005579
- Haugland RP 2005.** Indicators for Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and other metal ions. In: The handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies. MTZ Spence, 10. Auflage, Molecular Probes: 875-933

7. Literaturverzeichnis

- Hein L, Ishii K, Coughlin SR, Kobilka BK 1994.** Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 269:27719-27726
- Hepp R, Puri N, Hohenstein AC, Crawford GL, Whiteheart SW, Roche PA 2005.** Phosphorylation of SNAP-23 regulates exocytosis from mast cells. *J Biol Chem* 280:6610-6620
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL 1997.** International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 49:253-278
- Hug F, Diener M, Scharrer E 1996.** Modulation by fish oil diet of eicosanoid-induced anion secretion in the rat distal colon. *Z Ernahrungswiss* 35:323-331
- Hyman PE, Clarke DD, Everett SL, Sonne B, Stewart D, Harada T, Walsh JH, Taylor IL 1985.** Gastric acid secretory function in preterm infants. *J Pediatr* 106:467-471
- Ikehara O, Hayashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Mochizuki T, Hoshino M, Suzuki Y 2010.** Proteinase-activated receptors-1 and 2 induce electrogenic Cl⁻ secretion in the mouse cecum by distinct mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299:G115-125
- Irani AM, Schwartz LB 1989.** Mast cell heterogeneity. *Clin Exp Allergy* 19:143-155
- Iwabuchi K, Kubota Y, Ito C, Watanabe T, Watanabe T, Yanai K 2004.** Methamphetamine and brain histamine: a study using histamine-related gene knockout mice. *Ann N Y Acad Sci* 1025:129-134
- Ji Y, Sakata Y, Yang Q, Li X, Xu M, Yoder S, Langhans W, Tso P 2012.** Activation of rat intestinal mucosal mast cells by fat absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302:G1292-1300
- Kaever V, Resch K 2001.** Antiphlogistika und Immuntherapeutika. Pharmakotherapie der Entzündung und des Immunsystems. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Herausgeber: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K in Urban & Fischer Verlag, München, 393-428
- Kato M, Nishida S, Kitasato H, Sakata N, Kawai S 2001.** Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes. *J Pharm Pharmacol* 53:1679-1685
- Kato Y, Kita Y, Nishio M, Hirasawa Y, Ito K, Yamanaka T, Motoyama Y, Seki J 1999.** In vitro antiplatelet profile of FR171113, a novel non-peptide thrombin receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 384:197-202
- Kelsay K 2003.** Psychological aspects of food allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 3: 41-46
- Kim N, Luster AD 2007.** Regulation of immune cells by eicosanoid receptors. *Scientific World Journal* 1:1307-1328

7. Literaturverzeichnis

- Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC 2000.** Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118: 1001-1011
- Knudsen T, Johansen T 1989.** Na⁺ -K⁺ pump activity in rat peritoneal mast cells: inhibition by extracellular calcium. *Br J Pharmacol* 96:773-778
- Koboziev I, Karlsson F, Grisham MB 2010.** Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1207 Suppl 1: E86-93
- Kopic S, Geibel JP 2013.** Gastric acid, calcium absorption, and their impact on bone health. *Physiol Rev* 93:189-268
- Kőszegi Z, Kovács P, Wilhelm M, Atlasz T, Babai N, Kállai V, Hernádi I 2006.** The application of in vivo microiontophoresis for the investigation of mast cell-neuron interactions in the rat brain. *J Biochem Biophys Methods* 69:227-231
- Kraneveld AD, Sagar S, Garssen J, Folkerts G 2012.** The two faces of mast cells in food allergy and allergic asthma: the possible concept of Yin Yang. *Biochim Biophys Acta* 1822:93-99
- Krug SM, Fromm M, Günzel D 2009.** Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J* 97: 2202-2211
- Kugler EM, Mazzuoli G, Demir IE, Ceyhan GO, Zeller F, Schemann M 2012.** Activity of protease-activated receptors in primary cultured human myenteric neurons. *Front Neurosci* 6:133
- Kulczycki A Jr, Isersky C, Metzger H 1974.** The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells: I. Evidence for specific binding of IgE. *J Exp Med* 139:600-616
- Kuwahara A, Bowen S, Wang J, Condon C, Cooke HJ 1987.** Epithelial responses evoked by stimulation of submucosal neurons in guinea pig distal colon. *Am J Physiol* 252:G667-674
- Lazarov N, Rozloznik M, Reindl S, Rey-Ares V, Dutschmann M, Gratzl M 2006.** Expression of histamine receptors and effect of histamine in the rat carotid body chemoafferent pathway. *Eur J Neurosci* 24:3431-3444
- Lebenthal E, Lee PC 1980.** Development of functional responses in human exocrine pancreas. *Pediatrics* 66:556-560
- Leurs R, Chazot PL, Shenton FC, Lim HD, de Esch IJ 2009.** Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H4 receptor. *Br J Pharmacol* 157:14-23
- Leurs R, Smit MJ, Bast A, Timmerman H 1991.** Homologous histamine H1 receptor desensitization results in reduction of H1 receptor agonist efficacy. *Eur J Pharmacol* 196:319-322
- Leurs R, Smit MJ, Timmerman H 1995.** Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther* 66:413-463

7. Literaturverzeichnis

- Leurs R, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Ruat M, Schwartz JC 1994.** Guinea pig histamine H1 receptor. II. Stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways. *J Neurochem* 62:519-527
- Lindström CG, Rosengren JE, Fork FT 1979.** Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn* 20:523-536
- Liu S, Hu HZ, Gao N, Gao C, Wang G, Wang X, Peck OC, Kim G, Gao X, Xia Y, Wood JD 2003.** Neuroimmune interactions in guinea pig stomach and small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G154-164
- Lundius EG, Sanchez-Alavez M, Ghochani Y, Klaus J, Tabarean IV 2010.** Histamine influences body temperature by acting at H1 and H3 receptors on distinct populations of preoptic neurons. *J Neurosci* 30:4369-4381
- Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF, Meng Q, Humbert M, Barnes NC, Robinson DS, Ying S, Kay AB 2000.** Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol* 105:99-107
- Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, Amasheh M, Amasheh S 2010.** Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B* 180:591-598
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K 1997.** 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem* 122:498-505
- Maurer M 2011.** Allergie vom Soforttyp (Typ I) – Mastzellen und Frühphasenreaktion. In: Allergologie-Handbuch. Grundlagen und klinische Praxis. 2. Auflage, Herausgeber: Saloga J, Klimek L, Buhl R, Mann W, Knop J, Grabbe S in Schattauer GmbH, Verlag für Medizin und Naturwissenschaften, Stuttgart, 79-91
- Mayer L, Shlien R 1987.** Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med* 166:1471-1483
- McCabe RD, Smith PL 1984.** Effects of histamine and histamine receptor antagonists on ion transport in rabbit descending colon. *Am J Physiol* 247:G411-418
- McConalogue K, Furness JB 1994.** Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 8:51-76
- Meissner G 1857.** Über die Nerven der Darmwand. Henle und Pfenfer, Z Ration Med N F 8:364-366
- Mestres P, Diener M, Rummel W 1992a.** Histo- and immunocytochemical characterization of the neurons of the mucosal plexus in the rat colon. *Acta Anat* 143:268-274
- Mestres P, Diener M, Rummel W 1992b.** Electron microscopy of the mucosal plexus of the rat colon. *Acta Anat* 143:275-282
- Michel RH 1975.** Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* 41:81-147

7. Literaturverzeichnis

- Moghaddami M, Cummins A, Mayrhofer G 1998.** Lymphocyte-filled villi: comparison with other lymphoid aggregations in the mucosa of the human small intestine. *Gastroenterology* 115:1414-1425
- Moncoq K, Trieber CA, Young HS 2007.** The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J Biol Chem* 282:9748-9757
- Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD 2010.** Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol* 3:111-128
- Mueller K, Michel K, Krueger D, Demir IE, Ceyhan GO, Zeller F, Kreis ME, Schemann M 2011.** Activity of protease-activated receptors in the human submucous plexus. *Gastroenterology* 141:2088-2097
- Nuutinen S, Panula P 2011.** Histamine in neurotransmission and brain diseases. *Adv Exp Med Biol* 709:95-107
- O'Malley KE, Sloan T, Joyce P, Baird AW 1993.** Type I hypersensitivity reactions in intestinal mucosae from rats infected with *Fasciola hepatica*. *Parasite Immunol* 15:449-453
- Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Fukuoka T, Dai Y, Noguchi K 2010.** Expression of leukotriene receptors in the rat dorsal root ganglion and the effects on pain behaviors. *Mol Pain* 6:57
- Pan Z, Zhao X, Brotto M 2012.** Fluorescence-based measurement of store-operated calcium entry in live cells: from cultured cancer cell to skeletal muscle fiber. *J Vis Exp* doi: 10.3791/3415
- Parekh AB, Penner R 1997.** Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77: 901-930
- Parsons DS, Paterson CR 1965.** Fluid and solute transport across rat colonic epithelium. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 50:220-231
- Paton WD 1951.** Compound 48/80: a potent histamine liberator. *Br J Pharmacol Chemother* 6:499-508
- Pearce FL 1991.** Biological effects of histamine: an overview. *Agents Actions* 33:4-7
- Pearce FL, Thompson HL 1986.** Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor. *J Physiol* 372:379-393
- Perdue MH, Masson S, Wershil BK, Galli SJ 1991.** Role of mast cells in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis. Correction of the diminished secretory response in genetically mast cell-deficient W/W^v mice by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 87:687-693
- Phillips RJ, Powley TL 2007.** Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Auton Neurosci* 136:1-19
- Rangachari PK 1992.** Histamine: mercurial messenger in the gut. *Am J Physiol* 262:G1-13
- Rangachari PK, Prior T 1994.** Functional subtyping of histamine receptors on the canine proximal colonic mucosa. *J Pharmacol Exp Ther* 271:1016-1026

7. Literaturverzeichnis

- Rao KN, Brown MA 2008.** Mast cells: multifaceted cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1143:83-104
- Reed DE, Barajas-Lopez C, Cottrell G, Velazquez-Rocha S, Dery O, Grady EF, Bunnett NW, Vanner SJ 2003.** Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* 547: 531-542
- Rehn M, Diener M 2012.** Cysteinyl leukotrienes mediate the response of submucosal ganglia from rat colon by bradykinin. *Eur J Pharmacol* 681:100-106
- Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Günzel D, Fromm M 2010.** Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 123:1913-1921
- Rottem M, Mekori YA 2005.** Mast cells and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 4:21-27
- Russel DA 1986.** Mast cells in the regulation of intestinal electrolyte transport. *Am J Physiol* 251:G253-262
- Russel DA, Castro GA 1989.** Immunological regulation of colonic ion transport. *Am J Physiol* 256:G396-403
- Sampson HA 1999a.** Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 103:717-728
- Sampson HA 1999b.** Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 103:981-989
- Sand E, Themner-Persson A, Ekblad E 2009.** Mast cells reduce survival of myenteric neurons in culture. *Neuropharmacology* 56:522-530
- Schäfer T, Böhler E, Ruhdorfer S, Weigl L, Wessner D, Heinrich J, Filipiak B, Wichmann HE, Ring J 2001.** Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. *Allergy* 56:1172-1179
- Schemann M 2000.** Enterisches Nervensystem und Innervation des Magen-Darm-Traktes. In: Physiologie der Haustiere. 3. Auflage, Herausgeber: von Engelhardt W, Breves G im Enke Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- Schemann M, Camilleri M 2013.** Functions and imaging of mast cell and neural axis of the gut. *Gastroenterology* 144:698-704
- Schemann M, Kugler EM, Buhner S, Eastwood C, Donovan J, Jiang W, Grundy D 2012.** The mast cell degranulator compound 48/80 directly activates neurons. *PLoS One* 7:e52104
- Schemann M, Michel K, Ceregrzyn M, Zeller F, Seidl S, Bischoff SC 2005.** Human mast cell mediator cocktail excites neurons in human and guinea-pig enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 17:281-289
- Schultheiss G, Hennig B, Schunack W, Prinz G, Diener M 2006.** Histamine-induced secretion across rat distal colon: involvement of histamine H1 and H2 receptors. *Eur J Pharmacol* 546:161-170
- Schuster VL 1998.** Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* 60:221-242

7. Literaturverzeichnis

- Schwartz JC 2011.** The histamine H3 receptor: from discovery to clinical trials with pitolisant. *Br J Pharmacol* 163:713-721
- Segal M, Korkotian E 2014.** Endoplasmic reticulum calcium stores in dendritic spines. *Front Neuroanat* 8:64
- Shea-Donohue T, Notari L, Stiltz J, Sun R, Madden KB, Urban JF Jr, Zhao A 2010.** Role of enteric nerves in immune-mediated changes in protease-activated receptor 2 effects on gut function. *Neurogastroenterol Motil* 22:1138-e291
- Sicherer SH, Sampson HA 2010.** Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 125:S116-125
- Song ZM, Costa M, Brookes SJ 1998.** Projections of submucous neurons to the myenteric plexus in the guinea pig small intestine. *J Comp Neurol* 399:255-268
- Spahn TW, Kucharzik T 2004.** Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* 53:456-465
- Stark H 2007.** Histamine Receptors. *Biotrend Reviews* No. 01, Herausgeber: Kathmann M, Biotrend Chemicals AG.
- Stead RH, Dixon MF, Bramwell NH, Riddell RH, Bienenstock J 1989.** Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* 97:575-585
- Štampelj M, Ferjan I 2005.** Signaling pathway in nerve growth factor induced histamine release from rat mast cells. *Inflamm Res* 54:344-349
- Strabel D, Diener M 1995.** Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 274:181-191
- Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y 1997.** The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 159:1739-1745
- Surprenant A 1994.** Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. *Annu Rev Physiol* 56:169-175
- Tateson JE, Randall RW, Reynolds CH, Jackson WP, Bhattacharjee P, Salmon JA, Garland LG 1988.** Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment in vitro and ex vivo. *Br J Pharmacol* 94(2):528-539
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D 2012.** Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1822:21-33
- Trikha S, Lee EC, Jeremic AM 2010.** Cell secretion: current structural and biochemical insights. *ScientificWorldJournal* 10:2054-2069
- Tsien RY, Poenie M 1986.** Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling. *Trends Biochem Sci* 11:450-455
- Ulbricht W 1998.** Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 133:1-54
- Untersmayr E, Jensen-Jarolim E 2008.** The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J Allergy Clin Immunol* 121:1301-1308

7. Literaturverzeichnis

- Ussing HH, Zerahn K 1951.** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23:110-127
- Vergnolle N 2000.** Review article: proteinase-activated receptors – novel signals for gastrointestinal pathophysiology. *Aliment Pharmacol Ther* 14:257-266
- Verlinden A, Hesta M, Millet S, Janssens GP 2006.** Food allergy in dogs and cats: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46:259-273
- Vighi G, Marcucci F, Sensi L, Di Cara G, Frati F 2008.** Allergy and the gastrointestinal system. *Clin Exp Immunol* 153:3-6
- Walker AK, Park WM, Chuang JC, Perello M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Zigman JM 2013.** Characterization of gastric and neuronal histaminergic populations using a transgenic mouse model. *PLoS One* 8:e60276
- Wang GD, Wang X, Xia Y, Liu S, Qu MH, Ren W, Wood JD 2009.** Stimulation of spinal afferents evokes slowly-activating excitatory responses in enteric neurons in parallel with release of mast cell proteases in guinea pig ileum and colon. *Gastroenterology* 136:A19
- Wang H, Uhl JJ, Reiser G 2002.** Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia* 37:53-63
- Wang Q, Large WA 1993.** Action of histamine on single smooth muscle cells dispersed from the rabbit pulmonary artery. *J Physiol* 468:125-139
- Wang YZ, Cooke HJ, Su HC, Fertel R 1990.** Histamine augments colonic secretion in guinea pig distal colon. *Am J Physiol* 258:G432-439
- Wang YZ, Palmer JM, Cooke HJ 1991.** Neuroimmune regulation of colonic secretion in guinea pigs. *Am J Physiol* 260:G307-314
- Wolf JL, Bye WA 1984.** The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annu Rev Med* 35:95-112
- Wood JD 1991.** Communication between minibrain in gut and enteric immune system. *Physiology* 6:64-69
- Wood JD 2012.** Nonruminant Nutrition Symposium: Neurogastroenterology and food allergies. *J Anim Sci* 90:1213-1223
- Wood JD, Alpers DH, Andrews PL 1999.** Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 45:II 6-16
- Young E, Stoneham MD, Petruckevitch A, Barton J, Rona R 1994.** A population study of food intolerance. *Lancet* 343:1127-1130
- Yu LC 2012.** Intestinal epithelial barrier dysfunction in food hypersensitivity. *J Allergy (Cairo)* doi: 10.1155/2012/596081
- Zhao A, Morimoto M, Dawson H, Elfrey JE, Madden KB, Gause WC, Min B, Finkelman FD, Urban JF Jr, Shea-Donohue T 2005.** Immune regulation of protease-activated receptor-1 expression in murine small intestine during *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *J Immunol* 175:2563-2569

8. Eigene Publikationen

Pouokam E, Bell A, Diener M 2013. Actions of Angeli's salt, a nitroxyl (HNO) donor, on ion transport across mucosa-submucosa preparations from rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 715:133-141

Rehn M, Bader S, Bell A, Diener M 2013. Distribution of voltage-dependent and intracellular Ca^{2+} channels in submucosal neurons from rat distal colon. *Cell Tissue Res* 353:355-366

Bell A, Althaus M, Diener M 2014. Communication between mast cells and rat submucosal neurons. *Pflugers Arch* doi:10.1007/s00424-014-1609-9

Publizierte Abstracts:

Bell A, Diener M 2013. The effect of histamine on rat submucosal neurons. *J Physiol Biochem* 69:665

Pouokam E, Bell A, Diener M 2013. Actions of nitroxyl (HNO) on ion transport across rat distal colon. *J Physiol Biochem* 69:660

Bell A, Diener M 2013. Communication between rat submucosal neurons and RBL-2H3-cells. *Auton Neurosci Bas Clin* 177:29

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Martin Diener bedanken - dafür, dass seine Tür immer offen stand, für die vielen guten Ideen und seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Kurz gesagt: Vielen Dank für die hervorragende Betreuung! Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Diener für die tolle Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Vor allem danke ich Brigitta Brück, Eva Haas, Bärbel Schmidt und Alice Stockinger für die tatkräftige Unterstützung im Labor und meinen Mitdoktorandinnen Sandra Bader und Lisa Würner für ihre Hilfsbereitschaft und natürlich die vielen gemeinsamen Lacher. Der Frühstücksrunde – einer wundervollen Institution mit wechselnder Zusammensetzung – danke ich für die vielen lustigen Zusammenkünfte. Ein großes Dankeschön geht auch an alle anderen Institutsmitarbeiter, die alle zu der angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Ich danke meinem Mann Martin für die tatkräftige Unterstützung und Geduld, unserem Sohn Leonard dafür, dass es ihn gibt und meinen Eltern, die diese Arbeit durch Ihren „Babysitter-Einsatz“ in den letzten Monaten ein Stück weiter gebracht haben.

10. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Thesis selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Anna Bell



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6393-1



9 783835 196393 1